

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

---

**CRISTINA MOREIRA DE SOUSA**

**GLÂNDULA DE DEFESA DO MILÍPEDE *Urostreptus atrobrunneus*:  
ESTRUTURA E CONTEÚDO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular.

**Março - 2014**

**CRISTINA MOREIRA DE SOUSA**

**GLÂNDULA DE DEFESA DO MILÍPEDE *Urostreptus atrobrunneus*:  
ESTRUTURA E CONTEÚDO**

**Orientadora: Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti**

**Co-orientadora: Lucilene Delazari dos Santos**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular

**RIO CLARO  
2014**

595.61 Sousa, Cristina Moreira de  
S725g Glândula de defesa do milípede *Urostreptus atrobrunneus*:  
estrutura e conteúdo / Cristina Moreira de Sousa. - Rio Claro,  
2014

98 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti

Coorientador: Lucilene Delazari dos Santos

1. Milípede. 2. Mecanismos de defesa. 3. Diplopoda. 4.  
Secreção defensiva. 5. Histologia. 6. Ultraestrutura. 7.  
Cromatografia gasosa. 8. Espectrometria de massas. I. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** GLÂNDULA DE DEFESA DO MILÍPEDE UROSTREPTUS ATROBRUNNEUS:  
ESTRUTURA E CONTEÚDO

**AUTORA:** CRISTINA MOREIRA DE SOUSA

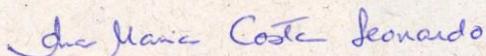
**ORIENTADORA:** Profa. Dra. CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI

**CO-ORIENTADORA:** Profa. Dra. LUCILENE DELAZARI DOS SANTOS

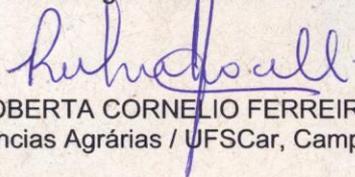
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI  
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro



Profa. Dra. ANA MARIA COSTA LEONARDO  
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro



Profa. Dra. ROBERTA CORNELIO FERREIRA NOCELLI  
Centro de Ciências Agrárias / UFSCar, Campus Araras

Data da realização: 21 de fevereiro de 2014.

*Dedico este trabalho ao meu pai, que me  
deu todo seu apoio nestes dois anos de  
mestrado, mesmo que distante...*

## *Agradecimentos*

*Primeiramente agradeço à Deus por toda força concedida, pelos obstáculos no caminho, que me fizeram crescer, pelas pessoas certas na minha vida e pela coragem...*

*Agradeço à minha mãe e ao meu irmão.*

*Agradeço à professora Dra. Carmem S. Fontanetti Christofolletti, pela amizade, paciência, conselhos, pela excelente orientação, enfim por toda sabedoria compartilhada...não tenho palavras para expressar minha gratidão...*

*Agradeço ao meu grupo de pesquisa, que é simplesmente "The best", Cintya, Annelise, Ana Cláudia (Matraca), Júlia, Raphael (Bairral), Jorge, Janaína, Nilton (Agroboy), Thaís, Cleiton, Yádira...muito obrigada pela amizade, por "pegarem no pé" e por toda ajuda com os trabalhos. São as pessoas que dão um colorido no meu dia a dia.*

*Agradeço às minhas super amigas Keyla Boralli, minha irmã, Camila Fontanetti, pela sua delicadeza, Camila A. Coelho e Cibele pelas "farofas" na nossa vila rsrsrsrs, Cintya Christofolletti, pela amizade incrível...*

*Agradeço aos técnicos do laboratório por toda ajuda e paciência, Gerson Mello Souza, Mônica Iamonte, Pablo H. Nunes, Antonio Yabuki, Sebastião Zanão Filho. À Cristiane Miléo, como sempre salvando a minha vida com os benditos esquemas e pranchas...*

*Meus agradecimentos à UNESP, Rjo Claro, por me fornecer toda estrutura necessária para o desenvolvimento dos meus trabalhos, ao Centro de Estudos de Insetos sociais (CEIS), pela disponibilidade dos equipamentos, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos concedida (processo: 2011/15278-9).*

*"O tempo não se ocupa em realizar as nossas esperanças: faz o seu trabalho e voa..."*

*(Eurípedes)*

*Não sei... Se a vida é curta  
Ou longa demais pra nós,  
Mas sei que nada do que vivemos  
Tem sentido, se não tocamos o coração das pessoas.*

*Muitas vezes basta ser:  
Colo que acolhe,  
Braço que envolve,  
Palavra que conforta,  
Silêncio que respeita,  
Alegria que contagia,  
Lágrima que corre,  
Olhar que acaricia,  
Desejo que sacia,  
Amor que promove.*

*E isso não é coisa de outro mundo,  
É o que dá sentido à vida.  
É o que faz com que ela  
Não seja nem curta,  
Nem longa demais,  
Mas que seja intensa,  
Verdadeira, pura... Enquanto durar.*

*(Cora Corafina)*

## RESUMO

Diplópodos são animais intimamente envolvidos com a manutenção do ecossistema, pois apresentam uma contribuição bastante significativa para o meio ambiente; revolvem o solo durante a locomoção, o que ocasiona aeração do mesmo e melhora a ação de microrganismos, na medida em que auxiliam no aumento da microflora através de suas fezes e através da alimentação de matéria orgânica em decomposição. Estes animais não apresentam populações numerosas, mas podem ocorrer explosões populacionais, decorrentes de mudanças climáticas, utilização de pesticidas entre outros desequilíbrios ambientais. Apresentam poucos predadores devido ao exoesqueleto resistente que os tornam impalatáveis, além da presença de glândulas de defesa que liberam fortes substâncias de ação repulsiva. As estratégias de defesa dos milípedes podem ser classificadas em físicas e químicas, onde se destacam o ato de enrolar-se e o fluido defensivo, respectivamente. O milípede *Urostreptus atrobrunneus* tem apresentado pontos de infestação em centros urbanos do estado de São Paulo, causando muitos transtornos à população humana. Por se tratar de uma espécie pouco conhecida, realizar um estudo sobre as glândulas de defesa destes animais é interessante, uma vez que a mesma vem apresentando um maior contato com populações humanas e de outros animais. Face ao exposto foi objetivo deste trabalho: 1) Realizar uma revisão sobre os mecanismos de defesa dos milípedes, comparando-os com os encontrados nos artrópodes e correlacionando as semelhanças observadas entre os grupos. 2) Descrever a morfologia da glândula de defesa do milípede *U. atrobrunneus* por meio de técnicas histológica, histoquímica e ultraestrutural. 3) Analisar os compostos voláteis presentes na secreção defensiva do milípede por meio da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). As análises permitiram verificar que a glândula de defesa do milípede *U. atrobrunneus* é do tipo 2, segundo a classificação proposta na literatura por Eisner et al. (1978) para glândulas de defesa de diplópodos; esta glândula é composta por um saco glandular esférico dotado de um ducto; este tipo glandular é comumente encontrado nos representantes da ordem Spirostreptida; o epitélio da glândula é formado por células glandulares classificadas como de classe 1 e classe 3, de acordo com as descrições propostas por Noirot e Quennedy (1974, 1991), para células glandulares de insetos; a estrutura glandular apresenta externamente uma musculatura bem desenvolvida. A secreção defensiva apresenta benzoquinonas, benzaldeídos e os isômeros destes compostos em sua constituição, os quais são característicos da ordem Spirostreptida, a qual pertence o

milípede *U. atrobrunneus*. A secreção defensiva dos milípedes compartilha de muitas semelhanças com as secreções defensivas de outros artrópodes, ou seja, este grupo utiliza praticamente as mesmas substâncias tóxicas e voláteis para repelir predadores e se proteger. Existe semelhança também quanto ao aparelho glandular, o qual na maioria das vezes é uma estrutura sacular provida de um ducto.

**Palavras-chave:** Diplopoda, mecanismos de defesa, secreção defensiva, histologia, ultraestrutura, cromatografia gasosa-espectrometria de massas (GC-MS).

## ABSTRACT

Diplopods are animals intimately involved in ecosystem maintaining since they show a very significant contribution to the environment; revolve the ground during transportation, which leads to aeration of the same and improves the action of microorganisms, to the extent that assist in the microflora increase a through their feces and by feeding on decaying organic matter. These animals do not have large populations, but population explosions resulting from climate change, use of pesticides and other environmental imbalances. Have few predators due to the tough exoskeleton that make them unpalatable, and the presence of defensive glands that release substances of strong repulsive action. The defense strategies of millipedes can be classified into physical and chemical, which highlights the act of rolling up and defensive fluid, respectively. The millipede *Urostreptus atrobrunneus* have presented points of infestation in urban centers of the São Paulo state, Brazil, causing much disruption to the human population. Because it is a little-known species, conduct a study on the defense glands of these animals is interesting, since it has shown greater contact with human populations and other animals. Given the above, the objective of this study was: 1) Conduct a review of the millipedes defense mechanisms, comparing them with those found in arthropods and correlating the similarities observed between the groups. 2) Describe the morphology of the defense gland millipede *U. atrobrunneus* by histological, histochemical and ultrastructural techniques. 3) Analyze the volatile compounds present in the defensive secretion of the millipede by coupled mass spectrometry gas chromatography (GC- MS). The analysis allows to verify that the gland 's defense of *U. atrobrunneus* is of type 2, according to the classification proposed in the literature by Eisner et al. (1978) for glands defense diplopods; this gland is composed of a spherical glandular bag fitted with a duct, this glandular type is commonly found in representatives of the Spirostreptida' order. The epithelium of the gland is formed by gland cells are classified as class 1 and class 3, according to the description proposed by Noirot and Quennedy (1974; 1991) in glandular cell of insects; externally glandular structure has a well-developed musculature. The defensive secretion has benzoquinones, benzaldehydes and isomers of these compounds in its constitution, which are characteristic of the Spirostreptida' order, which the millipede *U. atrobrunneus* belongs. The defensive secretions of millipedes shares many similarities with the defensive secretions of other arthropods, ie, this group uses virtually the same toxic and volatile substances to repel predators and protect

themselves. Similarity also exists as to the glandular system, which in most cases is a sac-like structure provided with a duct.

**Keywords:** Diplopoda, defense mechanisms, defensive secretion, histology, ultrastructure, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2.REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>13</b>
2.1 INFESTAÇÃO POR DIPLÓPODOS .....	13
2.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DOS MILÍPEDES .....	15
2.3 IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA DOS MILÍPEDES .....	17
2.4 MECANISMOS DE DEFESA EM MILÍPEDES .....	19
ARTIGO 1 .....	20
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>46</b>
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>47</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>50</b>
ARTIGO 2 .....	51
ARTIGO 3 .....	76
<b>6.CONCLUSÕES FINAIS .....</b>	<b>91</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>93</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Myriapoda é um subfilo dos artrópodes que agrupa os animais segmentados com um elevado número de pernas, os quais compreendem as classes: Chilopoda, Diplopoda, Pauropoda e Symphyla. Os miriápodes são agregados com os Hexapoda (insetos e classes próximas) num grupo geralmente sem categoria taxonômica, denominado Tracheata, antigo Uniramia, que inclui os artrópodes cujos apêndices não são ramificados (RUPPERT et al., 2005).

A classe Diplopoda compreende os animais que são conhecidos geralmente como milípedes, em alusão ao número de pernas que possuem, ou seja, dois pares por segmento, e mais comumente, no Brasil, conhecidos como piolho-de-cobra, emboá, gongolô, etc. São animais que possuem hábitos predominantemente noturnos, evitam a luz e vivem sob folhas, rochas, troncos; alguns habitam cavernas e ninhos de formigas e cupins (KIME; GOLOVATCH, 2000).

Apresentam distribuição cosmopolita, podendo ser encontrados em todas as regiões zoogeográficas, exceto na Antártida. São mais abundantes nos trópicos, sendo a fauna tropical, particularmente pouco conhecida; poucas espécies são encontradas no litoral, deserto ou em ambiente semiaquático (KIME; GOLOVATCH, 2000).

Atualmente são reconhecidas 144 famílias de milípedes, os quais são classificados em 15 ordens, que estão dispostas em três subclasses: Penicillata, Pentazonia e Helminthomorpha. A subclasse basal Penicillata contém representantes que são caracterizados como milípedes providos de cerdas, são habitantes do solo, muito pequenos, com cutícula não calcificada, o grupo contém cerca de 80 espécies nominadas. A subclasse Pentazonia (que compreende três ordens, Glomeridesmida, Glomerida e Sphaerotheriida) é representada pelos milípedes de corpo curto, comprimido, os quais são capazes de enrolar-se em uma esfera fechada. A subclasse Helminthomorpha, compreende animais com uma cutícula fortemente calcificada, que compreende a maioria das espécies de milípedes (BUENO-VILLEGAS et al., 2004).

Cerca de 12.000 espécies já foram descritas em todo mundo, mas há estimativa de que exista em torno de 80.000 (HOFFMAN et al., 2002). Entre as 20 famílias de diplópodos brasileiros, as mais conhecidas são Leptodesmidae, Spirostreptidae e Rhinocricidae.

A alimentação destes animais consiste de detritos em geral, matéria orgânica em decomposição, frutas, musgos, além de relativa quantidade de matéria mineral do solo (SCHUBART, 1942). Deste modo, este grupo é considerado importante na dinâmica do

solo, provocando maior aeração e enriquecimento da matéria orgânica nele presente. Nos desertos, os milípedes sobrevivem consumindo detritos orgânicos que se aglomeram nas bases das plantas (CRAWFORD et al., 1987). Alguns milípedes chegam a comer plantas vivas, mas isso geralmente se consiste de material macio e facilmente digerível, tais como briófitas, brotos novos, ou raízes finas (BAILEY; DE MENDONCA, 1990). Existem milípedes que apresentam uma dieta mais especializada. O milípede *Polyxenus lagurus* alimenta-se de algas que crescem nos troncos das árvores (EISENBEIS; WICHARD, 1987). Algumas poucas espécies são carnívoras (HOFFMAN; PAYNE, 1969) e várias delas se alimentam de restos de animais mortos, incluindo caramujos e lesmas (SRIVASTAVA; SRIVASTAVA, 1967). Entretanto, o sistema digestório é pobremente adaptado ao consumo de uma dieta carnívora na maioria das espécies.

A maioria dos milípedes desloca-se de forma lenta e deste modo são incapazes de recorrer à fuga para evitar ataques, sendo assim recorrem a meios físicos ou químicos de defesa, dentre estes os que mais se destacam são: o comportamento de enrolar-se e o ato de ejetar um fluido nocivo de suas glândulas de defesa (MEINWALD et al., 1966).

As glândulas de defesa estão presentes na maioria dos milípedes, exceto nos representantes da subclasse Penicillata, e das ordens Sphaerotheriida e Chordeumatida; geralmente há apenas um par de glândulas de defesa por segmento, o que indica que estas evoluíram após o desenvolvimento dos diplossegmentos (HOPKIN; READ, 1992).

A presença dos sais de cálcio no tegumento torna os milípedes muito resistentes, e a presença das glândulas de defesa nestes animais torna-os praticamente impalatáveis e faz com que apresentem pouco ou nenhum inimigo natural (RUPPERT et al., 2005).

Mesmo diante destas características, que dificultam a ação de predadores, estes animais normalmente não apresentam populações numerosas, porém, por algumas razões podem apresentar certo desequilíbrio populacional em decorrência de mudanças climáticas e da utilização de pesticidas. Muitos casos já foram relatados nesse sentido, onde diplópodos tornaram-se pragas, destruindo plantações ou infestando residências humanas. Recentemente, o milípede *U. atrobrunneus* tem ocasionado este tipo de problema (FONTANETTI et al., 2010a).

Em virtude disso, nos últimos anos, as migrações e explosões populacionais de milípedes, bem como infestações destes em centros urbanos ou em áreas agrícolas ocasionando prejuízos econômicos, têm se tornado comum, o que atraiu a atenção de

muitos pesquisadores (NIIJIMA; SHINOHARA, 1988; BOCCARDO et al., 1997; 2002; FONTANETTI et al., 2010a).

Foi notificada uma infestação da espécie de milípede *Urostreptus atrobrunneus* (Spirostreptida: Spirostreptidae) nas cidades de Paulínia (BOCCARDO, 1998) e Campinas (FONTANETTI et al, 2010a), ambas localizadas no estado de São Paulo, Brasil. Esta espécie foi descrita por Pierozzi e Fontanetti, 2006 e embora alguns estudos estejam sendo desenvolvidos (FONTANETTI et al., 2010b; 2012; MOREIRA-DE-SOUSA; FONTANETTI, 2012) muito da biologia e comportamento reprodutivo da mesma permanecem desconhecidos.

Diante do fato da espécie *U. atrobrunneus* ser considerada uma provável “praga” em centros urbanos do estado de São Paulo, torna-se interessante investigar o mecanismo de defesa que esta apresenta, bem como a estrutura deste sistema e os compostos presentes em sua secreção defensiva, visto que há o contato da espécie com a população humana e até mesmo com outros animais, que pode ocasionar acidentes.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Infestação por diplópodos**

Diplópodos normalmente apresentam equilíbrio populacional, salvo as exceções em que as alterações ambientais favorecem sua proliferação. A utilização de adubação orgânica, por exemplo, aumenta as chances de uma explosão populacional de algumas espécies, bem como o depósito de lixo oriundo de podas de árvores e matos, que oferecem alimento em abundância e abrigo para estes animais (FONTANETTI et al., 2007).

Apesar do papel de suma importância que diplópodos apresentam na decomposição de processos naturais em ecossistemas terrestres, muitos trabalhos apresentam os milípedes em seu status de pragas.

Algumas espécies atingiram proporções de peste, alimentando-se de raízes, como é o caso da espécie *Blaniulus guttulatus* (HOPKIN; READ, 1992). Na Austrália, o julida *Ommatoiulus moreletii* foi uma praga em algumas áreas onde invadiram residências (BAKER, 1985; MCKILLUP, BAYLEY, 1990).

Na África, o algodão e o amendoim são consumidos por diplópodos da ordem Spirostreptida e os números destes animais atingiram proporções epidêmicas (HOPKIN, READ, 1992).

Kania e Tracz (2005) realizaram estudos sobre a expansão populacional de diplópodos na Polônia e Europa bem como em outras regiões do mundo. Os autores propuseram quatro possíveis razões para a ocorrência do aumento no número de indivíduos de *Ommatoiulus sabulosus*: 1- fatores climáticos; 2- abundância de alimento no ambiente, a procura por novos recursos alimentares e falta de competição com outra espécie por alimento; 3- procura por lugares pra depositar seus ovos; 4- procura por lugares seguros para passar o inverno.

Sobre a infestação do milípede *Urostreptus atrobrunneus* (Spirostreptidae) nas cidades de Paulínia e Campinas, no estado de São Paulo (BOCCARDO, 1998; FONTANETTI et al., 2007) que também representou um indício de que esta espécie poderia tornar-se uma provável praga impulsionou os pesquisadores a avaliarem quais os efeitos o inseticida Bendiocarb® poderia provocar na infestação do milípede *U. atrobrunneus*, na cidade Campinas, São Paulo (FONTANETTI et al., 2010a). O inseticida foi testado em condições laboratoriais e logo após sua aplicação observou-se que os milípedes comportaram-se de modo a contrair seus corpos e expelir secreção de suas glândulas de defesa, seguido de sua morte. Houve uma grande mortalidade, demonstrando a eficácia do inseticida, pois este atua sobre o sistema nervoso central, e de fato contribui para o controle destes animais. No entanto, constatou-se neste trabalho que este inseticida pode ocasionar contaminação do meio ambiente, além de sua alta toxicidade para seres humanos.

Pensa-se que estes animais são inofensivos, pois as reclamações sobre os diplópodos sempre residiram em sua presença incômoda, quando em grande número, o desagradável odor que exalam quando mortos, as infestações e danos econômicos que provocam. No entanto, acidentes com diplópodos são muito comuns e podem se tornar graves, porém dificilmente são notificados.

O jornal “Daily Mail” publicou em março de 2009, uma infestação em Tallarook, Central Victoria, Austrália, pelo milípede *Ommatoiulus moreletii*, o qual causou prejuízos, pelo fato destes animais serem esmagados cruzando trilhos de trens, causando cancelamentos de comboios devido à perturbação de equipamento de sinalização. No mesmo ano foi registrado que milhares de milípedes invadiram 1,2 milhas de pista, causando atrasos e cancelamentos de trens perto de Melbourne, no sudeste da Austrália. Esta é uma espécie nativa de Portugal e foi acidentalmente introduzida na Austrália, onde desde então se tornou uma praga invasora.

Recentemente foi noticiado que uma infestação de milípedes pode ter sido uma das causas de um acidente envolvendo dois trens na cidade de Clarkson, na Austrália. Os trilhos da via, de acordo com o jornal “Daily Mail (Setembro de 2013)”, estariam cobertos por centenas de milípedes portugueses, que foram esmagados e fizeram com que o trem escorregasse e batesse em outra composição estacionada.

Observa-se que quando os milípedes encontram as condições ideais, como alimentos em grande quantidade associados às condições ambientais favoráveis para seu desenvolvimento resultam em explosões populacionais. Vale ressaltar que essa alta proliferação afeta não só de modo incômodo, mas também pode afetar a economia, uma vez que estas explosões populacionais também ocorrem em lavouras e podem ocasionar danos significativos.

## **2.2 Importância econômica dos milípedes**

Brade-Birks (1929; 1930) comentou que, embora diplópodos sejam benéficos, também podem ser prejudiciais e isso parece ser um consenso de opiniões entre os que trabalham com plantas cultivadas. Em comparação com os insetos, seus efeitos econômicos em escala global são negligenciáveis; os tipos de perturbações podem ser manifestados de duas maneiras: primeiro se alimentando nas culturas e segundo, quando ocorrem em grandes agregações especialmente em casas.

Danos econômicos significativos nas colheitas de raízes foram ocasionados pelo milípede *Blaniulus guttulatus* (HOPKIN; READ, 1992).

Foram realizadas várias reclamações sobre milípedes que causaram danos às lavouras, a maioria dos relatos foi na cultura de beterraba e batata, mas morango, pepino, pomares de frutos e flores também foram relatados como alvos para os milípedes *Brachydesmus superus*, *Oxidus gracilis* e vários outros blaniulídeos (Julida) em regiões temperadas (MAFF, 1984).

Cloudsley-Thompson (1950) afirmou que entre 1944 e 1949, mais de 100 casos de danos causados por milípedes foram registrados na Grã-Bretanha, sendo 90% destes casos atribuídos ao milípede *Blaniulus guttulatus*, em sua maioria em culturas de batata ou de beterraba. De acordo com Biernaux (1966), danos deste tipo em uma plantação de beterraba na Bélgica em 1965, causaram uma diminuição de 22% em peso total da safra e uma redução de 25% em peso de açúcar produzido, deste modo, milípedes podem ter importância econômica local considerável.

Há relatos de que os piolhos-de-cobra também podem danificar sementes em germinação de plantas florestais, como a acácia negra, causando falhas no plantio e obrigando o replante em grande número de covas. Atacam ainda batata, pepino, couve-flor, trigo e milho entre outras (CORSEUIL et al., 1986). Schubart (1942) descreveu o ataque de *Orthomorpha coarctata* (Polydesmida) e *Oxidus gracilis* (Polydesmida) em samambaias, além do ataque da espécie *O. coarctata* a sementeiras de couve, beralha e outras plantas, sendo a primeira contribuição sobre os danos causados por estes animais em plantas cultivadas no Brasil. Esta espécie já foi registrada para os estados do Amazonas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Mato Grosso, Pará, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro e São Paulo (SCHUBART, 1945), todavia, deve ocorrer em outros estados.

Boock e Lordello (1952) assinalaram os danos causados por *Pseudonannolene paulista* (Spirostreptida) aos tubérculos de batatinha no estado de São Paulo, acarretando perdas de 30% na produção.

Lordello (1954) relatou perdas totais ocasionadas por *Gymnostreptus olivaceus* (Spirostreptida) em culturas de beterraba e melão no estado de São Paulo. Peracchi e Nunes (1972) relataram o dano ocasionado por *Orthoporus fuscipes* (Spirostreptida) às raízes de mandioca. No sul do Brasil, os diplópodos de importância agrícola pertencem ao gênero *Julus* (Julida).

Gassen (1996) descreveu que nas lavouras de milho sob plantio direto, *Julus* sp. e *Orthomorpha* sp., foi possível observar que os milípedes concentravam-se no sulco da semeadura por causa do solo descompactado, o que facilitava a penetração e proteção contra fatores adversos. No fundo do sulco, consumiam as sementes e plântulas.

Há tempo tem-se investigado meios de controlar as infestações por diplópodos nos campos cultiváveis e, segundo Corseuil e Cruz (1975), as iscas tóxicas com farelo de trigo ou arroz em mistura com carbaril a 7,5% foram as medidas que melhor apresentaram sucesso como método de controle desses animais.

Utilizaram-se ainda preparos de farelo de trigo com triclorfon ou igual quantidade de diazinom 40 PM, que deveriam ser preparados uma espécie de pasta com água, adicionando duas colheres de açúcar. Misturas de tártaro emético e de açúcar, distribuídas em caixas de fósforo nos locais infestados pela praga também foram práticas bastante empregadas com o intuito de afastar os diplópodos (GUERRA, 1985).

Dentre as diversas medidas, o tratamento de sementes com inseticidas, ou a aplicação destes no sulco de semeadura, também foram práticas utilizadas e que se

manifestaram eficientes na proteção de plantas de milho contra os danos ocasionados pelos diplópodos (GASSEN, 1996).

Outros fenômenos desta natureza foram relatados por Boccardo et al. (1997; 2002) no Brasil; nos anos 90 foi observada uma explosão populacional do milípede *Plusioporus setiger* (Spirostreptida) em plantações de café na região do Alto do Paranaíba, Minas Gerais, uma região de cerrado, desflorestada nos anos 70 para cultura de café (BOCCARDO et al., 2002). Com o propósito de controlar os surtos populacionais, os agricultores utilizaram agrotóxicos organofosforados, carbamatos e piretróides, porém não obtiveram sucesso; segundo Boccardo e Fernandes (2000), isso se deve ao fato de que os diplópodos, principalmente na fase adulta, apresentam um exoesqueleto calcificado rígido que interfere na penetração de produtos aplicados topicamente. Devido às características biológicas dos diplópodos, tais como a presença de um exoesqueleto rígido e calcificado, a utilização de métodos de aplicação por contato é dificultada, sugeriu-se então, a utilização de iscas tóxicas contendo extrato etanólico bruto de frutos da pimenta-do-reino como alternativa viável no controle deste grupo animal (ROMÃO et al., 2008).

### **2.3 Importância ecológica dos milípedes**

Nos ecossistemas naturais, o material orgânico depositado pelas plantas é muitas vezes indisponível, porque muitos dos nutrientes ainda estão ligados na estrutura física da planta. A decomposição real de moléculas complexas a partir de serapilheira, folhas e madeira fragmentadas é realizada quase exclusivamente por microrganismos que residem no solo, especificamente, os fungos e bactérias; estes microrganismos são os únicos que possuem enzimas capazes de quebrar os compostos complexos produzidos pelas plantas. A ciclagem de nutrientes, portanto, envolve a atividade conjunta de toda uma comunidade de organismos do solo. Deste modo, o papel detritívoro dos milípedes torna estes animais elementos essenciais e importantes como intervenientes desse ciclo (FARFAN, 2010).

Os impactos causados pelos milípedes no meio ambiente e no ecossistema como um todo possuem uma repercussão bastante interessante, pois estes animais podem causar tanto benefícios quanto prejuízos.

O efeito que a alimentação dos milípedes provoca para os microrganismos do solo, bem como para a dinâmica de nutrientes presentes neste, representa não só

enriquecimento para solo, mas também sinaliza a possibilidade de condições favoráveis para uma situação de infestação destes milípedes (NIIJIMA, 1984).

Os diplópodos são um dos principais componentes da fauna do solo envolvidos com a formação do mesmo; eles representam uma considerável importância ecológica para desagregação de detritos, dentro do ciclo de decomposição (BUENO-VILLEGAS et al., 2004). Segundo os autores, o papel do grupo tem sido estudado principalmente em ecossistemas temperados, mas não em florestas tropicais, apesar do fato de que os milípedes atingem o máximo de diversidade e biomassa neste tipo de ecossistema e são provavelmente, os maiores artrópodes que ocorrem no solo e na serapilheira deste ambiente (SWIFT et al., 1979; BUENO-VILLEGAS et al., 2004). Categorizados predominantemente como saprófagos, os milípedes contribuem para a melhoria da parte húmica do solo, além de auxiliarem no aumento da microflora através de suas fezes (CURRY, 1994).

O papel dos milípedes em processos de decomposição tem sido amplamente estudado. Um estudo das macrofaunas em florestas de savana, bem como de habitats associados, demonstrou que os diplópodos representam 36% do total da densidade da fauna do solo e até 75% da fauna do solo em biomassa (DANGERFIELD, 1990).

Estes animais apresentam um trato digestório que não é bem equipado com enzimas especializadas, ou seja, que os capacite a digerir a matéria orgânica em decomposição, deste modo suspeita-se que os microrganismos presentes no canal alimentar é que desempenham um papel determinante na digestão (BLOWER, 1985) e sendo assim, influenciam indiretamente no fluxo de nutrientes (ANDERSON et al., 1985; BLOWER, 1985; ANDERSON; LEONARD, 1988; HOPKIN; READ, 1992).

Anderson e Bignell (1980) ilustraram essa limitação do trato digestório dos diplópodos mostrando que estes animais, bem como outros saprófagos não são diretamente responsáveis por mais de 10% da decomposição química, no entanto, por causa da atividade alimentar dos microrganismos, estes realizam 90% da decomposição química. Os diplópodos afetam a decomposição por meio da fragmentação e da inoculação da matéria orgânica com esporos de bactérias e fungos, e finalmente converte a matéria orgânica em húmus (BLOWER, 1995; DANGERFIELD, 1990).

A alteração física do solo também é decorrente da atividade de escavação provocada pelos milípedes, a qual resulta no aumento da porosidade, altera as características de umidade do solo, melhorando assim, a lixiviação de materiais solúveis pela água da chuva (ANDERSON; LEONARD, 1988). Uma vez que são animais

móveis podem efetuar uma rede de transferência de nutrientes de habitats para terras aráveis por meio da produção dos aglomerados fecais. Em conclusão, a atividade alimentar dos milípedes pode acarretar efeitos consideráveis para a produção agrícola, no que diz respeito à regulação do processo de decomposição, uma vez que retarda a liberação de nutrientes pelo fato de armazenar nutrientes no material fecal permanente, ou seja, a liberação é gradativa, de modo que o solo dificilmente estará empobrecido de nutrientes (DANGERFIELD, 1990).

Rawlins et al. (2006) concentraram seus estudos no papel do milípede *Glomeris marginata*, na decomposição da serapilheira. Os autores identificaram a importante função que os *Glomeris* representam como detritívoros, pois habitam a serapilheira de florestas que particularmente recobrem solo calcário.

Estes animais são responsáveis por ingerir serapilheira, assimilando 0,3-7% m/m do material ingerido, sendo o material fecal resultante, uma importante fonte de alimento para outros animais saprófagos, como, por exemplo, as minhocas (SHEU; WOLTERS, 1991). Estes animais são importantes na fragmentação de detritos, uma vez que aumentam a área de superfície disponível para o crescimento microbiano associado ao processo de decomposição durante a passagem intestinal e formação dos aglomerados fecais (RAWLINS et al., 2006; STRIGANOVA, 1971). A presença de *Glomeris* no solo amplia a diversidade microbiana, enquanto indiretamente, estimula a mineralização do nitrogênio e mobilização de cátions, como o potássio e o cálcio (ANDERSON et al., 1983; VISSER, 1985). Além disso, a formação de material fecal resultante do aumento da disponibilidade de nutrientes, como N e o P, para microrganismos, e a absorção destes nutrientes é dependente da disponibilidade de matéria orgânica lábil na serapilheira fragmentada (MARAUN; SCHEU, 1996).

#### **2.4 Mecanismos de defesa em milípedes**

Foi elaborado um artigo de revisão sobre este tema, o qual se encontra a seguir.

## ARTIGO 1

### Milípedes e seus mecanismos de defesa

Cristina Moreira de Sousa<sup>1</sup>, Lucilene Delazari dos Santos<sup>2</sup>, Carmem Silvia Fontanetti<sup>3</sup>

Departamento de Biologia – Instituto de Biociências, Rio Claro, SP, Brasil.

Av. 24-A, 1515, CEP: 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil

1: [cris.sousa.bio@hotmail.com](mailto:cris.sousa.bio@hotmail.com); 2: [lucilene@cevap.org.br](mailto:lucilene@cevap.org.br); 3: [fontanet@rc.unesp.br](mailto:fontanet@rc.unesp.br)

#### Resumo

Diplópodos são considerados importantes macro-artrópodes do solo. Tais animais desempenham papel fundamental na manutenção do ecossistema, pois atuam como decompositores, contribuindo com a biodegradação dos tecidos vegetais, melhorando e viabilizando a atividade microbiana, o que resulta em alteração na estrutura física do solo, pelo enriquecimento, aeração e humificação do mesmo. Normalmente não apresentam população numerosa, mas podem ocorrer explosões populacionais decorrentes de desequilíbrios ambientais, mudanças climáticas e pela utilização de pesticidas que podem eliminar possíveis competidores, possibilitando que algumas espécies apresentem status de praga. São animais que apresentam poucos inimigos naturais, entretanto, frente ao seu modo lento de locomoção, o que os impossibilita de reagirem prontamente aos ataques de predadores, os diplópodos utilizam mecanismos de defesa físicos e químicos. Dentre estes mecanismos, destacam-se o enrolamento do corpo (físico) e o fluido que o animal ejeta, proveniente das glândulas de defesa (químico). Nesse sentido, é objetivo deste trabalho realizar uma revisão bibliográfica sobre os mecanismos de defesa que os milípedes possuem, sobre a composição de suas glândulas de defesa, bem como a repercussão que estes mecanismos exercem na natureza, comparando tais glândulas nos artrópodes.

**Palavras-chaves:** mecanismos físicos de defesa, mecanismos químicos de defesa, esfera, cerdas, secreção defensiva.

## 1. Introdução

Diplópodos são animais que vivem em ambientes úmidos, sob folhas e troncos em decomposição e deste modo, representam papel fundamental na natureza, pois devido ao fato de se alimentarem de detritos em geral, matéria orgânica em decomposição, musgos e relativa quantidade de matéria mineral do solo, este grupo é considerado importante na dinâmica do solo, visto que desencadeiam processos importantes como enriquecimento, aeração e humificação do solo onde se encontram o que conseqüentemente, contribui para manutenção do equilíbrio do ecossistema (SCHUBART, 1942; RUPPERT et al., 2005; BRUSCA; BRUSCA, 2007).

A classe Diplopoda compreende os animais que são conhecidos geralmente como milípedes, em alusão ao número de pernas que possuem, ou seja, dois pares por segmento, e mais popularmente, no Brasil, são conhecidos como piolho-de-cobra, emboá, gongolô, etc. Os milípedes tipicamente apresentam muitos segmentos no tronco, mas algumas espécies africanas possuem apenas uns poucos e são frequentemente confundidas com isópodes oniscídeos, principalmente quando se enrolam. Embora a crença popular diga que os milípedes têm mil pernas, nenhum possui de fato mil pernas, embora haja um recordista, *Illacme plenipes*, uma espécie da Califórnia, com 750 pares de pernas (KIME; GOLOVATCH, 2000; BRUSCA; BRUSCA, 2007).

Estes animais possuem hábitos predominantemente noturnos, e por evitarem a luz, alguns habitam cavernas e ninhos de formigas e cupins. Apresentam distribuição cosmopolita e podem ser encontrados em todas as regiões zoogeográficas, com exceção da Antártida. São mais abundantes nos trópicos, sendo a fauna tropical, particularmente pouco conhecida; poucas espécies são encontradas no litoral, deserto ou em ambiente semiaquático (KIME; GOLOVATCH, 2000). Em alguns locais de ambientes tropicais, onde as minhocas são muitas vezes raras, os milípedes podem ser os principais formadores do solo (BRUSCA; BRUSCA, 2007).

Cerca de 12.000 espécies já foram descritas em todo mundo, mas há a estimativa de que exista em torno de 80.000 espécies (HOFFMAN et al., 2002). Atualmente são reconhecidas 144 famílias de milípedes, os quais são classificados em 15 ordens, que estão dispostas em três subclasses: Penicillata, Pentazonia e Helminthomorpha.

Dotados de um corpo cilíndrico com 25 a 100 segmentos, com cutícula geralmente calcária, mas sem epicutícula cerosa, o exoesqueleto da maioria dos diplópodos é fortemente calcificado. Como ocorre nos demais miriápodos, o corpo é dividido em uma cabeça e corpo multissegmentado; externamente, o tronco é

constituído por uma série de anéis cuticulares. A maior parte dos anéis é constituída de diplossegmentos derivados da fusão entre dois segmentos durante o desenvolvimento embrionário. Grande parte dos diplossegmentos apresenta dois pares de pernas, de onde deriva o nome Diplopoda (RUPPERT et al., 2005). A origem ventral as pernas é vista como uma adaptação para escavação (MANTON, 1961).

O fato destes animais apresentarem um tegumento resistente, impregnado por sais de cálcio, e glândulas de defesa em quase todos os segmentos de seu corpo, os coloca numa condição de poucos inimigos naturais, pois além de não agradar ao paladar dos predadores pelo exoesqueleto rígido, a secreção proveniente das glândulas de defesa apresenta-se composta por substâncias tóxicas bastante irritantes, de odor forte e desagradável, repelindo assim, os possíveis predadores (HOPKIN; READ, 1992; RUPPERT et al., 2005). Frente ao importante papel ecológico e econômico desempenhados pelos milípedes e pela carência de informações a respeito dos recursos físicos e químicos adotados por estes animais para proteção, este trabalho tem por objetivo apresentar os principais mecanismos de defesa dos diplópodos, bem como salientar a importância destes no meio em que vivem.

## **2. Inimigos naturais de diplópodos**

Poucos dados estão disponíveis sobre milípedes que são vítimas de predadores. No nordeste da Uganda, por exemplo, animais como galinhas, patos, perus e porcos se alimentam de milípedes (EBREGT et al., 2004a); mas também outras aves, répteis e mamíferos mantidos em cativeiro podem igualmente alimentar-se de milípedes; no entanto, estas observações não significam que os milípedes fazem parte da dieta habitual destes animais na natureza (HOPKIN; READ, 1992).

Estudos demonstraram que o estômago de inúmeras aves sul-africanas continham milípedes, indicando que estas podem superar os efeitos desencorajadores das glândulas defensivas destes animais. Nenhuma dessas aves é conhecida por fazer dos milípedes seu “cardápio” principal (HOPKIN; READ, 1992).

Os milípedes também podem ser vítimas de formigas e escorpiões (EBREGT et al., 2004b). Na África do Sul, insetos predadores (Hemiptera, Reduviidae) consomem principalmente espécies da família Spirostreptidae, que são maiores, enquanto que algumas espécies menores, tais como *Chersastus* (Spirobolidae) não são atacadas. O mesmo relato vale para ácaros parasitas que se alimentam de grandes números de

*Doratogonus* (Spirostreptidae), mas raramente são encontrados alimentando-se de *Chersastus* (LAWRENCE, 1984).

Alguns milípedes Julidae são frequentemente afetados por fungos ectoparasitas da ordem Laboulbeniales (ROSSI; BALAZUC, 1977). A ramificação das hifas infectam os três primeiros pares de pernas em fêmeas e os sete primeiros em machos, resultando na restrição de sua mobilidade. Segundo os autores, isto deve ocorrer devido ao fato de o diplópodo não ser mais capaz de orientar a marcha de modo eficiente ou pela ausência de glândulas de defesa nos cinco primeiros segmentos (BLOWER, 1985).

Outro tipo de predador bastante interessante são as larvas de besouro da família Phengodidae, que se alimentam de milípedes rotineiramente. Embora semelhantes a vermes e aparentemente inofensivas, as larvas de fengodídeos são caçadoras vorazes capazes de matar milípedes maiores do que elas mesmas, sua predação estratégica é única e foi descrita com detalhe por Tiemann (1967) para *Zarhipis integripennis*, um fengodídeo da Califórnia (EISNER et al., 1998). O comportamento da larva é descrito pelo autor da seguinte forma: a larva perfura a membrana na região do colo do milípede com suas peças bucais; o efeito dessa ação faz com que o milípede fique rapidamente imobilizado; ela consome o interior mole do milípede, pré-digerindo os tecidos com seus próprios fluidos entéricos que aparentemente regurgita enquanto se alimenta; apenas a parte do exoesqueleto do milípede não é consumida após a refeição. O que foi mais intrigante segundo a descrição de Tiemann, é que as glândulas de defesa do milípede durante o ataque parecem não desempenhar sua função (EISNER et al., 1998).

### **3. Mecanismos de defesa em diplópodos**

A maioria dos milípedes são animais que se deslocam de forma lenta e deste modo são incapazes de recorrer à fuga para evitar ataques, sendo assim recorrem a meios físicos ou químicos de defesa (MEINWALD et al., 1966; HOPKIN; READ, 1992; SHELLEY, 1999). Os milípedes estão entre os grupos de artrópodes mais protegidos (EISNER et al., 1978).

A reação dos milípedes diante de um ataque de predador é bastante diversificada, pois as reações variam conforme as espécies. Na maioria do tempo estes animais vivem escondidos no solo a fim de se proteger contra o calor e aridez, o que de certa forma já lhes confere um meio de proteção aos predadores (LAWRENCE, 1984).

#### **3.1 Mecanismos físicos de defesa**

Os mecanismos físicos de defesa correspondem ao comportamento imediato do animal quando perturbado. Antes mesmo de reagir, os milípedes contam com a proteção que seu exoesqueleto disponibiliza, pois funciona como uma primeira barreira, uma vez que a presença de sais de cálcio no tegumento torna estes animais muito resistentes e praticamente impalatáveis fazendo com que apresentem pouco ou nenhum inimigo natural (RUPPERT et al., 2005).

O ato de enrolar-se é o mais comum dentre os mecanismos de defesa físicos que os milípedes possuem, sendo que alguns somente apresentam variações na forma de enrolamento devido ao formato do corpo, há milípedes que formam uma esfera perfeita e outros que formam uma espiral.

Lawrence (1984) relatou que durante um estudo com milípedes juliformes, estes animais quando perturbados rapidamente viravam-se lateralmente e a partir dessa posição rolavam seu corpo em volta de sua cabeça, formando uma espécie de bobina, ou seja, uma “esfera plana” (Fig.1A); nesta posição, o lado mais duro de seu corpo é o que ficava exposto protegendo a cabeça, as pernas e a região ventral mais macia. O autor ainda descreveu que assim que o milípede percebeu que não havia mais perigo, desenrolou-se e afastou-se rapidamente.

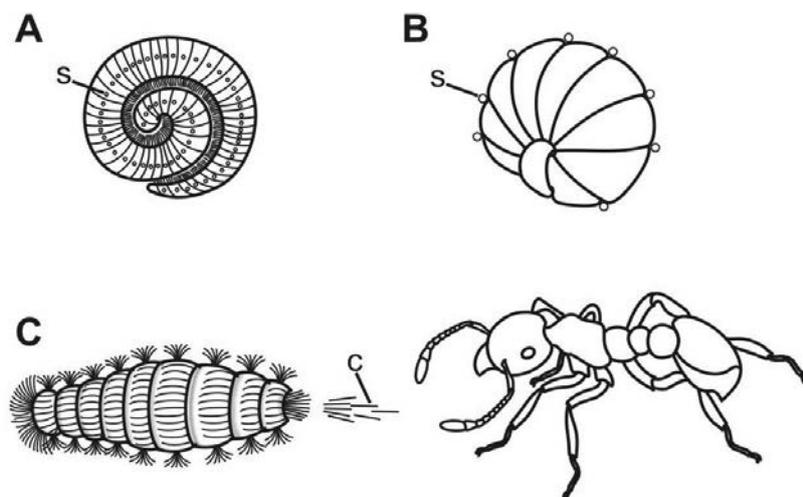
O milípede *Omopyge sudanica*, da família Odontopygidae, frequentemente encontrado no campo por agricultores no nordeste da Uganda e em outros lugares na África Oriental, foi utilizado em diversos experimentos de exposição a diferentes dietas, apresentando uma reação defensiva bastante diferente (EBREGT et al., 2007). Quando manuseado estes milípedes reagem de forma vigorosa e realizam movimentos violentos com o corpo, como de serpente, enquanto tentavam escapar. Em contrapartida, o milípede *Spirostreptus ibanda*, o qual é muito maior em comparação com a espécie *O. sudanica*, e também frequentemente encontrado no campo, apresenta comportamento bem menos ativo quando capturado (LAWRENCE, 1984).

O milípede *Glomeris marginata*, por exemplo, possui uma poderosa musculatura que lhes permitam enrolar-se de modo a formar uma esfera perfeita (Fig. 1B) firmemente fechada. Devido a esse comportamento estes diplópodos são chamados de “milípedes pílula” (“pill millipede”) (HOPKIN; READ, 1992).

Outra reação que os milípedes apresentam quando irritados ou incomodados de alguma forma, é o ato de defecar, como meio de se defender (LAWRENCE, 1984).

Além dos comportamentos já citados, os membros da subclasse Penicillata desenvolveram uma inteligente estratégia de defesa, atirando cerdas rígidas pela sua

extremidade posterior em formigas e outros predadores (SHELLEY, 1999; HOPKIN; READ, 1992). Este grupo conhecido por não ser protegido quimicamente, compreendem os polixenidas (ordem Polyxenida). Composto por cerca de 60 espécies, distribuídas em 4 famílias, estes animais possuem apenas alguns milímetros de comprimento, sendo pouco conhecidos pela maioria da população. O milípede *Polyxenus fasciculatus* (família Polyxenidae) se protege das formigas envolvendo-as com cerdas destacáveis lançadas a partir de dois tufos semelhantes a uma escova, presentes na parte posterior do corpo (EISNER et al., 1996). Quando atacado, ele reage de modo a lançar os tufos contra as formigas (Fig. 1C); as formigas carregadas com as cerdas desistem de seu ataque. As cerdas possuem ganchos nas pontas, que se enroscam com as farpas das cerdas das formigas ao longo do seu comprimento. Na tentativa de livrar-se de cerdas, as formigas podem ter sucesso apenas em afastar-se. As formigas contaminadas podem permanecer presas e morrer. Diferentemente da maioria dos milípedes que apresentam defesas químicas, os polixenidas, em vez disso, possuem uma arma mecânica (EISNER et al., 1996).



**Figura 1:** Esquemas representativos dos mecanismos físicos de defesa dos milípedes. (A). Enrolamento do tipo bobina ou “esfera plana”; (B). Esfera firmemente fechada; (C). Polyxenida lançando cerdas contra uma formiga. s: secreção; c: cerdas.

### 3.2 Mecanismos químicos de defesa

Os mecanismos químicos de defesa dos milípedes podem ser provenientes de sua coloração aposemática, das glândulas de defesa e do recurso da bioluminescência, apresentado por um gênero específico; todos estes mecanismos são artifícios que alertam os predadores sobre o que irão enfrentar ao atacá-los (MEINWALD et al., 1966; HOPKIN; READ, 1992; SHELLEY, 1999).

A coloração aposemática, ou seja, de advertência, está presente em milípedes vermelhos, amarelos e laranja brilhante; semelhante a alguns vertebrados, como lagartos e cobras habitantes de solos, estes animais desenvolveram estas colorações (mimetismo batesiano) com a finalidade de aparentar-se com outras espécies consideradas nocivas pelos predadores. Os milípedes mais coloridos são os polidésmidos, cujas pigmentações vermelha, laranja e azul brilhantes advertem sobre as suas secreções de defesa compostas por cianureto (SHELLEY, 1999).

A principal função da secreção defensiva dos milípedes é garantir proteção contra predadores, devido à presença de substâncias voláteis com características anestésicas e irritantes, com ação repelente. Porém, secundariamente essa secreção também desempenha um papel antimicrobiano e antifúngico, prevenindo o milípede de uma contaminação com microrganismos (HOPKIN; READ, 1992; ATTYGALLE et al., 1993; MARAKOV et al., 2010).

Milípedes não são animais agressivos e tão pouco violentos, no entanto apresentam em seus diplossegmentos glândulas de defesa (ou repugnatórias), as quais podem situar-se na região médio-dorsal ou lateralmente no corpo do animal; secretam líquidos tóxicos voláteis com propriedade repelente, o que lhe garante sua defesa. As substâncias defensivas deste grupo são bastante diversificadas e incluem quinonas, fenóis, aldeídos e até mesmo cianureto. Poucas espécies possuem toxinas fortes o suficiente para provocar a formação de bolhas na pele de humanos (VALDERRAMA et al., 2000; BRUSCA; BRUSCA, 2007).

Qualquer um que tenha manuseado milípedes, particularmente membros das ordens Spirobolida e Spirostreptida, que liberam grande descarga de 1,4-benzoquinona, sabe que estes animais podem ejetar suas secreções em grandes quantidades em resposta a provocação, mesmo suave (EISNER et al., 1978).

A espécie européia *Glomeris marginata* produz quinazolinonas, que pertence à mesma classe de substâncias da droga sintética Quaalude, um poderoso sedativo que quando em contato com aranhas armadeiras, por exemplo, durante um ataque faz com que estas simplesmente adormeçam ao serem expostas a esse defensivo químico (CARREL; EISNER, 1984).

Há registros de que uma espécie doméstica comum na América do Norte, introduzida há muito tempo da Ásia, *Oxidus gracilis*, a qual também libera defensivos químicos de forte odor quando perturbada (SHELLEY, 1999; HOPKIN; READ, 1992).

Tiemann (1964, 1967) e Causey e Tiemann (1969) realizaram um extenso trabalho de revisão com milípedes luminescentes do gênero *Motyxia*. Os pesquisadores fizeram inúmeras observações a cerca destes milípedes, dentre elas sobre os predadores mais conhecidos, bem como a reação dos milípedes perante aos ataques. Diante dos predadores, como os grandes centípedes geofilídeos, vaga-lumes (*Zarhipis integripennis*) e besouros carabídeos (*Pterostichis ater*) observaram que os *Motyxias* descarregam secreções repugnatórias da mesma forma como os outros milípedes o fazem, e que estas secreções apresentavam odor de cianeto de hidrogênio e benzaldeído. Os autores afirmaram ainda que a bioluminescência é rara entre milípedes e que é proveniente tanto da epiderme como da endocutícula.

Segundos os registros, não é atribuída nenhuma vantagem seletiva especial para a luminescência e fluorescência; supõe-se que são concomitantemente processos fisiológicos da epiderme, pois amostras secas dos milípedes mantêm a fluorescência, mas perdem a luminescência (CAUSEY; TIEMANN, 1969).

Causey e Tiemann (1969) registraram que em uma noite escura, o milípede que emite bioluminescência pode ser visto a mais de 10 metros de distância. Os autores pensaram que a causa da luminescência era a secreção proveniente da glândula de defesa mas, segundo Davenport et al. (1952) é possível que seja produzido um extrato que é luminoso por um curto período de tempo e que seria uma proteção adicional ao odor do fluido repugnatório.

Embora existam muitos estudos com este gênero, o significado adaptativo permanece desconhecido. Marek et al. (2011) apontam que a bioluminescência tem uma única origem evolutiva em milípedes e que serve como um sinal de alerta aposemático, com o intuito de deter os predadores mamíferos noturnos. Entre os numerosos exemplos de bioluminescência na natureza, esta foi a primeira experiência de campo com organismos que demonstram que bioluminescência funciona como um sinal de alerta.

Essas espécies, de ocorrência limitada a três condados da Califórnia, a emissão de luz envolve uma fotoproteína que contém um cromóforo com porfirina em seu grupo funcional. O mecanismo fotogênico básico é mais similar à da GFP (proteína verde fluorescente) da medusa (*Aequorea victoria*), do que a do mais intimamente relacionado vaga-lume (*Photinus pyralis*); contudo, a estrutura das moléculas luminescentes permanece desconhecida e suas homologias às moléculas de outros animais são incertas (MAREK et al., 2011).

#### **4. Glândulas repugnatórias ou de defesa em diplópodos**

Presentes na maioria dos milípedes, com exceção dos representantes da subclasse Penicillata e das ordens Sphaerotheriida e Chordeumatida, as glândulas de defesa geralmente ocorrem aos pares, alojadas em cada diplossegmento (HOPKIN; READ, 1992).

Eisner et al. (1996) descreveram que as glândulas defensivas se abrem em pequenos poros localizados nas laterais do corpo do animal, sendo que os cinco primeiros segmentos e o último são desprovidos de glândula, típico para descrição de membros da ordem Spirobolida.

Hoffman e Knight (1967, 1970), apresentaram em suas descrições para Spirostreptidae, que os poros começavam a aparecer no sexto segmento do corpo do animal.

A descrição das glândulas de defesa dos milípedes constitui uma importante ferramenta para classificação dos grupos taxonômicos, bem como para própria identificação das espécies. Indivíduos pertencentes à mesma família apresentam o aparelho glandular muito similar, enquanto que a composição da secreção presente na glândula pode diferir consideravelmente (WU et al., 2007).

Quando se sentem ameaçados os milípedes secretam uma substância tóxica, de cheiro forte e desagradável. Uma série de compostos foi identificada nas diferentes ordens de milípedes, dentre esses compostos os que mais se destacaram foram as benzoquinonas e hidroquinonas, fenóis, ácido benzóico, benzaldeídos, alcaloides, iodo, cloro e cianeto (EISNER et al., 1998; DEML; HUTH, 2000; KUWAHARA et al., 2002; ARAB et al., 2003).

Uma classificação dos milípedes pode ser feita de acordo com a substância que descarregam de suas glândulas de defesa. Benzoquinonas são comuns nas ordens Julida, Spirobolidae Spirostreptida; fenóis são compostos comuns a milípedes da ordem Callipodida; compostos cianogênicos representam a ordem Polydesmida; quinazolinonas à ordem Glomerida e alcalóides à ordem Polyzoniida (EISNER et al., 1996).

Existem alguns trabalhos que apontam que o conteúdo presente na secreção das glândulas de defesa dos milípedes podem apresentar constituintes químicos que variam conforme os diferentes habitats em que se encontram e também pelas diferentes condições fisiológicas as quais os milípedes estão sujeitos, como por exemplo, diferentes estádios de desenvolvimento ou de reprodução. Taira et al. (2003)

conduziram um experimento com o milípede *O. gracilis*, onde identificaram os compostos de secreção do mesmo e observaram que os compostos da secreção apresentaram variações significativas e em quantidade, dependendo do local de coleta, o que sugere uma influência de fatores ambientais sobre a sua produção.

Existem na literatura diversos trabalhos sobre o conteúdo da secreção da glândula de defesa dos milípedes. Em Wood et al. (2000) através das técnicas de cromatografia gasosa e espectrômetro de massa (GC-MS), a análise da secreção defensiva do milípede *Buzonium crassipes* apresentou em sua composição três componentes voláteis:  $\beta$ -pineno (35%), limoneno (6%) e um novo alcalóide, o buzonanime (59%). Neste trabalho, os compostos isolados da secreção defensiva do milípede foram testados utilizando-se ninhos de formigas, da espécie *Formica obscuripes*, a partir de um bioensaio antipredador, uma vez que esta formiga representa uma potencial predadora de larvas de *Tenebrio molitor*. Diante dos testes, os autores observaram que os componentes apresentavam ação repelente para as formigas, e dentre os três, o buzonamine foi o que apresentou maior ação repelente.

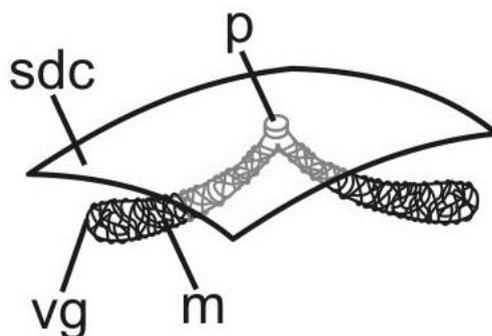
Shear et al. (2010) realizaram um estudo com *Tetracion jonesi*, uma espécie de milípede encontrado em cavernas ao sul do Planalto de Cumberland (EUA). Esse estudo demonstrou através de análises com cromatografia gasosa/espectrometria de massas que o único componente químico de defesa presente na glândula de defesa desta espécie de milípede é o p-cresol, um composto volátil encontrado também em outras espécies pertencentes às famílias Abacionidae e Schizopetalidae.

Os estudos realizados com *Rhinocricus padbergi* (Spirobolida), uma espécie amplamente distribuída no sudeste do Brasil, demonstraram que as glândulas de defesa descarregam uma secreção de coloração amarelada, que aparece como pequenas gotas sobre o corpo. O conteúdo das glândulas foi analisado por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (GC-MS); os resultados mostraram que a secreção é constituída, principalmente, por dois compostos voláteis: metil-1,4 benzoquinona e 3,3 a 4,5-tetra-hidro-1H pirrolo-[2,3b] piridina-2,6 diona (ARAB et al., 2003).

#### **4.1 Aparelho glandular: tipos de glândulas de defesa existentes**

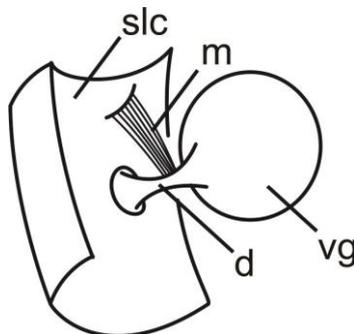
Eisner et al. (1978) reconheceu três tipos principais de glândulas de defesa em milípedes:

Tipo 1 (Fig. 2): ocorre em Glomerida, extensivamente estudada em *Glomeris marginata*; este milípede apresenta oito pares de glândulas, as quais se abrem médio-dorsalmente nos segmentos 4-11; cada glândula é envolta por uma rede de músculos que forçam a secreção para fora através das aberturas. A secreção é emitida no aspecto de gotas pegajosas, as quais agem como anti-formigas, sedativos e toxina para predadores. Aranhas são particularmente sensíveis aos efeitos sedativos da secreção.



**Figura 2.** Esquema representativo da glândula de defesa tipo 1. vg: vesícula glandular; m: musculatura; p: poro; sdc: superfície dorsal do corpo.

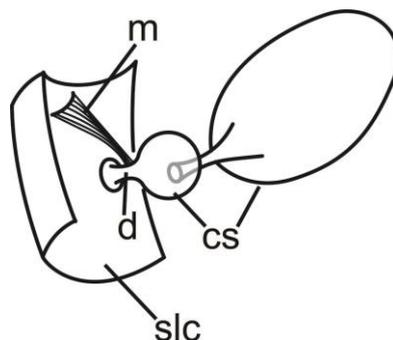
Tipo 2 (Fig. 3): esta glândula apresenta uma estrutura relativamente simples, pois consiste de uma saco esférico, contendo células secretoras, o qual se abre na superfície lateral do milípede através de um pequeno poro, estes ficam fechados em circunstâncias normais, porém quando há um estímulo, ocorre a descarga do conteúdo, a partir da contração do músculo que se encontra ligado ao ducto. Aparentemente este saco não é circundado por músculo, logo a emissão da secreção, provavelmente ocorre devido à pressão que aumenta em decorrência da hemolinfa.



**Figura 3.** Esquema representativo da glândula de defesa tipo 2. d: ducto; m: musculatura; slc: superfície lateral do corpo; vg: vesícula glandular.

Este tipo de glândula está presente na maioria das ordens incluindo Spirobolida, Spirostreptida, Julida, Callipodida, Platydesmida e Polyzoniida (EISNER et al., 1978). A secreção dessas glândulas contém uma gama muito ampla de produtos químicos, sendo a maioria com baixo peso molecular (<300). Em *Uroblaniulus canadensis* (Julida) a secreção é constituída por uma mistura de compostos alifáticos e benzoquinonas.

Tipo 3 (Fig. 4): este terceiro tipo é encontrado exclusivamente em Polydesmida, a única ordem capaz de secretar cianeto. O aroma de amêndoas é familiar para os que coletam as espécies. Em *Alpheloria corrugata*, a secreção é emitida por glândulas de defesa que apresentam dois compartimentos. No interior do compartimento menor aloja-se mandelonitrila, enquanto que no outro (o qual é separado por uma válvula) está contida uma enzima que catalisa a quebra de mandelonitrila em cianeto de hidrogênio e benzaldeído. O conteúdo destas câmaras é produzido por células secretoras especializadas, as quais podem ser encontradas nas paredes destas câmaras (HOPKIN; READ, 1992).



**Figura 4.** Esquema representativo da glândula de defesa tipo 3. cs: câmara secretora; d: ducto; m: musculatura; slc: superfície lateral do corpo.

Marakov et al. (2010) em seus estudos com glândulas de defesa de três espécies diferentes de diplópodos, *Polydesmus complanatus*, *Brachydesmus (Stylobrachydesmus) avalae* e *B. (S.) dadayi*, todos pertencentes a ordem Polydesmida, encontrou nove compostos diferentes, benzaldeído, benzil álcool, benzoilnitrila, benzil methyl cetona, ácido benzóico, benzil ethil cetona, mandelonitrila e benzoato mandelonitrila, compostos os quais foram identificados através de análises com cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID) e cromatografia gasosa/espectrometria de massa (GC-MS). É muito comum que espécies desta ordem produzam cianeto de hidrogênio, sendo denominadas então de cianogênicas.

Em geral, as secreções defensivas dos milípedes são misturas de compostos orgânicos com baixo peso molecular. No entanto, a caracterização química dos compostos de defesa dos milípedes é uma tarefa desafiadora, uma vez que as secreções são geralmente disponíveis em pequenas quantidades e, quase sempre, como misturas complexas de compostos estreitamente relacionados. Por conseguinte, apenas os componentes principais são frequentemente identificados (WU et al., 2007).

#### 4.2. Morfologia tecidual das glândulas de defesa

Os trabalhos existentes na literatura sobre a morfologia das glândulas de defesa dos diplópodos são extremamente escassos.

Woodring e Blum (1965) descreveram as glândulas de *Orthocricus arboreus*, salientando que a coloração escura da cutícula não parece estar relacionada com rigidez ou esclerotinização, uma vez que os estudos demonstraram que em áreas onde a flexibilidade é maior, a cutícula revelou-se mais escura do que em outras áreas. As células glandulares são sinciciais e são contínuas com as células epidérmicas. As descrições apontam que em diversas regiões da glândula, a íntima e a membrana basal apresentam-se extremamente dobradas, e que isto parece ser área de multiplicação de células da glândula. Os poucos grânulos encontrados nestas áreas são restritos a locais onde os núcleos são menos compactados. Na maior parte das regiões da glândula e porções glandulares do ducto, a membrana basal não apresenta dobras e a íntima é apenas ligeiramente dobrada. Os núcleos são dispersos e claramente sinciciais; numerosos grânulos estão presentes em regiões distintas ou agrupados no citoplasma e parecem ser de natureza fluida, em vez de cristais. Talvez cada aglomerado de grânulos represente o limite vago citoplasmático de uma célula individual (WOODRING; BLUM, 1965).

Woodring e Blum (1965) sugeriram que os grânulos encontrados representam, provavelmente, a secreção de quinona ou precursor da quinona das células glandulares. O mecanismo de secreção celular nas glândulas de defesa de *O. arboreus* parece ser holócrina, embora a hipótese da passagem através da íntima muito espessa não possa ser excluída; áreas isoladas da ruptura da íntima foram observadas. Os autores afirmaram que a membrana basal em artrópodes é considerada pela maioria dos pesquisadores como sendo um tecido conjuntivo derivado de certas células da hemolinfa.

Barth (1967) analisou de forma minuciosa as glândulas de defesa do diplópodo *R. padbergi*, de modo a descrever não só a morfologia destas glândulas, mas também o

funcionamento da mesma. Segundo o autor, o aparelho glandular é composto por uma vesícula volumosa e delicada, a qual possui um canal condutor cilíndrico que atravessa a espessa cutícula, além de um aparelho de fechamento situado dentro deste canal. O autor descreve todo o sistema como sendo uma invaginação da cutícula, onde a abertura do canal condutor representa o ponto de início da invaginação.

Na vesícula glandular, apesar de sua parede ser delicada, ela é relativamente resistente, pois foi possível observar que existe uma pressão constante que o líquido exerce no interior da glândula. Ao perfurar a vesícula observou-se que a secreção foi parcialmente expulsa, o que fez com que o autor supusesse que a parede da vesícula é extremamente elástica, uma vez que não contém elementos musculares. A parede da vesícula glandular é constituída por epitélio simples, revestido internamente por uma lamela cuticular, separado da cavidade do corpo por uma membrana basal; o canal condutor da glândula é cilíndrico, apresenta sua parede formada por uma camada de cutícula relativamente espessa e dobras circulares, irregulares e profundas. A cutícula é revestida na sua porção externa por um sincício hipodérmico típico, sendo este separado da cavidade geral do corpo por uma membrana basal forte que não acompanha as dobras da cutícula, essa construção permite que a parede do canal ganhe uma resistência mecânica muito elevada, de modo que numa situação de aumento de pressão na hemolinfa, a obstrução do canal é evitada (BARTH, 1967).

Barth (1967) descreveu ainda que existe um aparelho de fechamento, o qual se situa na extremidade distal, anterior a abertura externa do complexo glandular, interpretado como uma modificação da parede do canal. Este dispositivo é formado por uma cutícula espessa, de modo que sua configuração não pode ser deformada; em direção à abertura, o canal estreita-se ligeiramente. Na cavidade da invaginação insere-se um músculo forte, o qual se estende, em direção lateroventral, dentro do grande anel muscular segmental, prolongando-se até sua inserção na parede do corpo.

A expulsão da secreção efetua-se por meio da contração do músculo do aparelho de fechamento e da musculatura inteira do corpo, especialmente dos músculos longitudinais que reduzem o comprimento do animal, com isto, aumenta-se a pressão no interior da cavidade do corpo. Na ocasião do encurtamento extremo do corpo, a borda posterior do segmento anterior comprime a vesícula glandular, reforçando o mecanismo de expulsão (BARTH, 1967).

As observações histológicas que Barth (1967) realizou acerca das células glandulares demonstraram que assim como o aparelho glandular é de origem

ectodérmica, representando uma invaginação do integumento, o componente secretor do órgão também o é. As células glandulares que compõem a vesícula glandular formam um epitélio simples, as quais se apoiam numa forte membrana basal; os núcleos são achatados.

Neste trabalho, Barth (1967) afirmou que a respeito da função das células glandulares é possível observar quatro estádios:

Fase I: na zona média da célula formam-se concentrações de secreções difusas; as mitocôndrias localizam-se, quase que exclusivamente, sobre a face basal da célula.

Fase II: as concentrações de secreção difusas tornam-se mais densas, as esferas de secreção aumentam gradativamente de diâmetro e localizam-se em vacúolos, em forma de fenda, no protoplasma. As mitocôndrias aumentam em número e distribuem-se sobre todo o interior da célula.

Fase III: os vacúolos pequenos confluem em alguns grandes, preenchendo-se com esferas, maiores e menores. As mitocôndrias deslocam-se em direção à zona apical da célula e encontram-se ainda em número elevado no protoplasma.

Fase IV: os vacúolos juntam-se, formando um só vacúolo grande que ocupa mais do que a metade do volume da célula e que é preenchida por esferas de secreção. As mitocôndrias encontram-se agora quase exclusivamente na face apical da célula.

Durante a formação das esferas de secreção, ocorre no seu interior uma condensação secundária, que se inicia no centro de cada esfera e que pode ser comparada com o mesmo fato observado nas esferas de secreção das células lipócrinas das glândulas salivares de *Aedes scapularis* (Insecta, Diptera). A secreção não é de natureza lipídica e sua expulsão é um processo micro-apócrino. As esferas de secreção no interior da célula e a secreção contida na vesícula glandular têm uma composição química diferente; baseando-se na migração das mitocôndrias, o autor concluiu ainda que antes ou durante sua passagem através da face apical da célula, a secreção sofre uma modificação química por ação enzimática (BARTH, 1967).

Eisner et al. (1998) realizaram um estudo morfológico com as glândulas de defesa do milípede *Floridobolus penneri* e observaram que, como típico para os membros da ordem (Spirobolida), o milípede apresenta suas glândulas defensivas distribuídas aos pares em cada segmento e comportamento diante de um contato, conforme o esperado.

A descarga glandular provavelmente é efetuada por uma contração do músculo valvular e compressão simultânea do saco. A compressão do saco deve ser efetuada

indiretamente, possivelmente por pressão do aumento da hemocele ou por pressão dos músculos tegumentários que circundam as glândulas. Pode-se imaginar ambas as forças sendo provocadas pelo encurtamento dos segmentos locais, desencadeado pela contração do músculo intersegmental longitudinal (EISNER et al., 1998).

### **5. Efeitos causados pela secreção das glândulas de defesa dos milípedes**

Acidentes como queimaduras com esses animais já foram descritos (GIRARDIN; STEVESON, 2002), e embora não haja evidência de que qualquer ser humano tenha sido morto por um milípede (que têm sido conhecidos por matar lagartos), sua secreção pode causar considerável desconforto ao entrar em contato com a pele sensível, causando pigmentação e inflamação, e cegueira se entrar em contato com os olhos. Existem vários registros sobre as substâncias que compõem a secreção da glândula de defesa dos milípedes indicando que estas ocasionam uma forte irritação na pele e na mucosa dos olhos e nariz em humanos (WU et al., 2007).

Uma vez em contato com a pele humana, os líquidos e vapores expelidos podem provocar sensação de ardência, lembrando uma queimadura leve; o local torna-se hipercrômico instantaneamente, com a cor variando entre amarelo-claro e marrom-escuro, por ação das quinonas. Contatos prolongados com o animal (preso nas roupas, por exemplo) podem levar a lesões mais severas, com formação de vesículas, bolhas e exulcerações. O processo inflamatório está sempre presente, mesmo em lesões hipercrômicas discretas, e a hiperpigmentação pode persistir por meses. Os raros acidentes humanos descritos ocorreram em crianças e profissionais que coletaram animais para pesquisas sem o necessário cuidado (LIMA et al., 2010; HADDAD JUNIOR et al., 2000).

Quando as secreções do milípede entram em contato com a mucosa ocular, o comprometimento pode ser grave, com possibilidade de ocorrer conjuntivite relevante e ulceração da córnea, tendo, em um caso registrado por Musgrave (1943), em que o acidente evoluiu para perda total da visão em sete dias.

Foi relatado que a secreção de *Spiroboles bungii* inibe a divisão das células cancerosas humanas em cultura. Algumas tribos indígenas também se utilizam do extrato da secreção do milípede como veneno em pontas de flechas (HOPKIN; READ, 1992). A secreção pode ser pulverizada a distância considerável ao longo de 40 cm.

As secreções de defesa de certos milípedes Polydesmida exibiram atividade antifúngica por suprimir o crescimento micelial e a germinação de esporos de fungos

expostos a dez diferentes milípedes isolados em solos adjacentes. Neste trabalho, um grupo de compostos foi designado como sistema I, os quais foram identificados a partir de membros do Xystodesmidae, e consistiram de benzaldeído, ácido benzóico, cianeto de benzoílo, benzoato de metilo e mandelonitrila. O ácido benzóico e cianeto de benzoílo foram os melhores inibidores do crescimento micelial e germinação de esporos, atuando normalmente em concentrações de 250, 500 ou 1000 mg/mL. Uma mistura de quatro compostos de defesa (total de 125 mg/mL) reduziu a germinação de esporos de forma mais eficaz do que os compostos individuais e pareceu funcionar sinergicamente. As misturas que resultaram em benzoato de etila, guaiacol e fenol foram designadas como sistema II conforme relatado para espécie *Oxidus gracilis* (RONCADORI et al., 1985).

Valderrama et al. (2000), mostraram em seus estudos sobre um grupo de macacos selvagens, que estes se utilizavam de milípedes como meio de repelir mosquitos e outros ectoparasitas, principalmente durante as estações chuvosas; a secreção é avidamente procurada pelos macacos. As análises químicas realizadas neste trabalho revelaram que de fato os compostos presentes na secreção dos milípedes são potentes repelentes contra insetos, no entanto esses compostos também podem acarretar riscos, pois são compostos tóxicos e cancerígenos.

Macacos neotropicais do gênero *Cebus* se ungem com a secreção das glândulas de defesa friccionando os milípedes em sua pelagem. Um estudo realizado por Weldon et al. (2003) mostrou que os macacos-prego possuem o hábito de auto-ungir com a benzoquinona secretada pelos milípedes, uma atividade em que se encontra a hipótese de que a secreção de defesa seja uma barreira química para os mosquitos (WELDON et al., 2003).

## **6. Comparação das glândulas defensivas em artrópodes**

Assim como os diplópodos, outros animais também apresentam como mecanismo de defesa o ato de descarregar fluídos odoríferos, geralmente irritantes, quando manuseados ou de alguma forma perturbados (ROTH; EISNER, 1962; EISNER et al., 1963).

Uma extensa e interessante revisão sobre as defesas químicas em artrópodes foi realizada por Roth e Eisner (1962). Os autores relataram neste trabalho que as estruturas que produzem secreções defensivas em artrópodes são extraordinariamente variadas. As glândulas, como regra, são multicelulares, e consistem mais frequentemente de um

epitélio glandular e um reservatório no formato de saco cuticular de tamanho variado, onde a secreção geralmente é armazenada. Este epitélio é frequentemente a cobertura celular do próprio reservatório, mas, por vezes, toma a forma de um ou mais aglomerados de células dissociadas do reservatório.

A localização das glândulas, bem como o número por indivíduo, varia; elas podem localizar-se na cabeça, tórax ou abdómen, onde ocorrem individualmente ou em grupos; por exemplo, nas baratas, existem uma ou duas, em tenebrionídeos (Coleoptera), duas ou quatro, em milípedes há um par de glândulas localizadas lateralmente ou dorso-ventralmente e presentes na maioria dos segmentos corporais (ROTH; EISNER, 1962).

Citologicamente, as células do epitélio glandular frequentemente mostram uma elaborada especialização. Uma característica comum observada nas glândulas defensivas dos artrópodes é a presença de canais cuticulares intracelulares, através do qual os produtos de secreção são aparentemente descarregados a partir das células. Muitas delas produzem substâncias de alta toxicidade (por exemplo, quinonas, aldeídos, os ácidos graxos de cadeia curta, o ácido cianídrico); o organismo dos animais que os produzem consegue fazer com que os produtos das glândulas sejam fisiologicamente isolados do resto do sistema. A cutícula no reservatório pode também ser assimétrica, sendo impermeável a uma difusão para o exterior dos conteúdos armazenados. Além disso, os canalículos intracelulares pode, em si, serem condutos de sentido único, permitindo descarga para fora, mas não o retorno do fluxo. Existe a possibilidade de que em algumas glândulas, os princípios tóxicos sejam realmente sintetizados no reservatório a partir de uma série de precursores relativamente inofensivos fabricados separadamente das células. Deste modo, mais do que um composto pode ser segregado e mais de um tipo celular é encontrada no epitélio sugerindo uma conexão de células que trabalham simultaneamente. Em alguns grupos, a síntese de toxinas ocorre quando os reagentes são misturados no lúmen do reservatório (ROTH; EISNER, 1962).

Há uma variação considerável nos mecanismos pelos quais a descarga é efetuada entre os artrópodes, sendo que estas diferenciações podem ocorrer entre os próprios grupos.

A tabela 1 traz os modos de expulsão do fluido defensivo nos diferentes exemplos de animais.

**Tabela 1:** Exemplos de mecanismos de descarga do fluido defensivo em artrópodes (ROTH; EISNER, 1962; EISNER et al., 1963; PAVAN, 1968).

<b>Mecanismo de expulsão do fluido</b>	<b>Descrição do mecanismo</b>	<b>Onde aparece</b>
Compressão muscular	Fluído expelido pela compressão dos músculos circulares que envolvem o reservatório da glândula	<i>Anisomorpha buprestoides</i> (Insecta, Phamastodea)
Compressão do reservatório	Aumento da pressão do fluido existente na hemocele que circunda a glândula	<i>Poeciloceris bufonis</i> (Insecta, Orthoptera)
Combinação de pressão hidrostática com muscular	Contração dos músculos longitudinais que provoca alongamento do reservatório e a diminuição de seu volume	<i>Eurycotis floridana</i> (Insecta, Blattodea)
Combinação de elasticidade do reservatório com o aumento da pressão corporal	Músculos controlam a abertura do orifício	<i>Oncopeltus fasciatus</i> (Insecta, Hemiptera)
Ação da musculatura do corpo	Reservatórios inseridos na musculatura corporal, que atua junto com a pressão da hemolinfa	<i>Narceus gordanus</i> (Diplopoda, Spirobolida); provavelmente outros milípedes com glândulas semelhantes
Ar do sistema traqueal	Reservatório conectado ao tronco traqueal lateral	<i>Diploptera punctata</i> ( Insecta, Blattodea)
Ejeção de spray	Reação química explosiva no interior do reservatório provocada pelo oxigênio livre liberado, provocando pressão	Coleópteros do gênero <i>Brachinus</i>

Na maioria dos artrópodes as secreções defensivas são, provavelmente, produzidas metabolicamente, e isso demonstra que, provavelmente, a alimentação não contém os compostos de defesa. Por exemplo, em *Diptera*, o glicogênio ocorre abundantemente nas células das glândulas defensivas (ROTH; EISNER, 1962). Os experimentos mostraram que os grânulos em torno do aparelho secretor, são compostos fenólicos que podem ser os precursores das quinonas nos reservatórios. A orto-quinona produzida pelas glândulas coleteriais da barata *Periplaneta americana* é formada a partir de  $\beta$ -glicosídeo, seu precursor fenólico. Um  $\beta$ -glicosidase hidrolisa o  $\beta$ -glicosídeo e uma fenol-oxidase oxida o fenol com o agente de curtimento de quinona; a  $\beta$ -glicosidase e um polifenol-oxidase foram encontrados na traquéia (ROTH; EISNER, 1962).

Outro dado importante é a capacidade de direcionar o spray, a qual é claramente uma vantagem, uma vez que prevê a máxima eficácia com o mínimo de gasto de secreção. Em animais que descarregam um exsudado líquido ao invés de um pulverizador, pode haver disposições alternativas para minimizar o desperdício. Por exemplo, as larvas do besouro *Melasoma lapponica* (Coleoptera) após a descarga do fluido, apresentam um mecanismo que direciona o restante do fluido não utilizado de volta para os reservatórios. Quando a larva de *Chrysomela tremula* (Coleoptera) sofre muda, os revestimentos cuticulares dos reservatórios das glândulas torácica e abdominal, retém os seus conteúdos no tegumento larval; a pupa de *Chrysomela* retém o último tegumento larval (com sua secreção) acoplado aos segmentos abdominais terminais. Quando a pupa é estimulada, seus movimentos forçam o líquido para fora dos reservatórios da cutícula larval e recolhe o líquido em gotas grandes com as extremidades dos tubérculos larvais. As gotas de fluido são reintroduzidas para os reservatórios quando a pupa retorna à sua posição de repouso (ROTH; EISNER, 1962).

Em milípedes que descarregam quinonas, a descarga não é generalizada, no entanto, ocorre apenas a partir das glândulas que estão mais próximas ao estímulo. Só após persistente estimulação, a resposta eventualmente se espalha para segmentos adjacentes. Um comportamento semelhante de resposta ocorre no besouro de feijão mexicano, *Epilachna varivestis* (Coleoptera), o qual apresenta como fluido de defesa a própria hemolinfa; no adulto, as gotas de hemolinfa são liberadas a partir das articulações tíbio-femoral. Geralmente apenas a perna mais próxima do estímulo responde. A descarga simultânea a partir de todas as pernas ocorre apenas em resposta à

estimulação generalizada, conforme os insetos são manipulados. A larva de *Epilachna* também tem uma resposta localizada da hemolinfa, e tanto a hemolinfa larval quanto a do adulto é um forte repelente para formigas (EISNER et al., 1963).

Estes são alguns entre os inúmeros exemplos de defesas químicas, bem como a diversidade de seus mecanismos de ação em artrópodes. É possível observar que os artrópodes compartilham de várias semelhanças entre os modos de secretar os fluídos de defesa e os compostos utilizados em sua defesa.

## 7. Agradecimentos

As autoras agradecem à Cintya Aparecida Christofolletti e Ives Haifig pelas colaborações e à FAPESP (processo: 2011/15278-9) e CNPq pelo apoio financeiro.

## 8. Referências

ARAB, A.; ZACARIN, G. G.; FONTANETTI, C. S.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; SANTOS, M. G.; CABRERA, A. C. Compositions of the defensive secretion of the Neotropical millipede *Rhinocricus padbergi* Verhoeff 1938 (Diplopoda: Spirobolida: Rhinocricidae). **Entomotropica**, Maracay. v.18, n.2, p.79-82. 2003.

ATTYGALLE, A. B.; XU, S. C.; MEINWALD, J.; EISNER, T. Defensive secretion of the millipede *Floridobolus penneri*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 10, p. 1700-1706, 1993.

BARTH, R. Microanatomia e citologia das glândulas peçonhentas de *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Guanabara, **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 65, n. 2, p. 175-195, 1967.

BLOWER, J.G. Millipedes: Keys and notes for the identification of the species. Linnean Society of London/Estaurine and Brakisch-water Sciences association, London, 1985, 242 p.

BRUSCA, G. J.; BRUSCA, R. C. **Invertebrados**. 7ed. Guanabara Koogoan, 2007, 1098p.

CAUSEY, N. B.; TIEMANN, D. L. A Revision of the Bioluminescent Millipedes of the Genus "Motyxia" (Xystodesmidae, Polydesmida). **Proceedings of the American Philosophical Society**, v. 113, n. 1, p.14-33, 1969.

CARREL, J. E.; EISNER, T. Spider sedation induced by defensive chemicals of milliped prey. **Proc. Nati. Acad. Sci. USA**, v. 81, p. 806-810, 1984.

DAVENPORT, D.; WOOTTON, D. M.; CUSHING, J. E. The Biology of the Sierra Luminous Millipede, *Luminodesmus sequoiae*, Loomis and Davenport. **Biological Bulletin**, v. 102, p. 100-110, 1952.

EBREGT, E.; STRUIK, P.C.; ABIDIN, P.E.; ODONGO, B. Farmers' information on sweet potato production and millipede infestation in north-eastern Uganda. I. Associations between spatial and temporal crop diversity and the level of pest infestation. NJAS – Wageningen, **Journal of Life Sciences**, v. 52, p. 47-68, 2004a.

EBREGT, E.; STRUIK, P.C.; ABIDIN, P.E.; ODONGO, B. Farmers' information on sweet potato production and millipede infestation in north-eastern Uganda. II. Pest incidence and indigenous control strategies. NJAS – Wageningen, **Journal of Life Sciences**, v. 52, p. 69-84, 2004b.

EBREGT, E.; STRUIK, P.C.; ABIDIN, P.E.; ODONGO, B. Feeding activity of the East-African millipede *Omopyge sudanica* Kraus on different crop products in laboratory experiments. NJAS – Wageningen, **Journal of Life Sciences**, v. 54, p. 313-323, 2007.

EISNER, T. ALSOP, D.; HICKS, K.; MEINWALD, J. Defensive discretion of millipedes. **In: Arthropod venoms** (Handbook of Pharmacology n. 48) ed. S. Bettini, Springer-Verlag, Berlin, p. 41-72, 1978.

EISNER, H. E.; EISNER, T.; HURST, J. J. Hydrogen cyanide and benzaldehyde produced by millipedes. **Chem. In. (London)**, p. 124-125, 1963.

EISNER, T.; HURST, J. J.; MEINWALD, J. Defense mechanisms of arthropods. Xi. The structure, function, and phenolic secretions of the glands of a chordeumoid millipede and a carabid beetle. Department of Entomology and Department of Chemistry, Cornell University, Ithaca, N. Y. *Psyche*, v. 70, p. 94-116, 1963.

EISNER, T.; EISNER, M.; DEYRUP, M. Millipede defense: Use of detachable bristles to entangle ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 93, p. 10848-10851, 1996.

EISNER, T.; EISNER, M.; ATTYGALLE, A. B.; DEYMEINWALD, J. Rendering the inedible edible: Circumvention of a millipede's chemical defense by a predaceous beetle larva (Phengodidae). **Proc. Natl. Acad. Sci.** USA, v.95, p.1108-1113, 1998.

GIRARDIN, B. W.; STEVESONS. Millipedes – Health consequences. **Journal Emergency Nursing**, Saint Louis, v.28, 0.2, p.107-110, 2002.

HADDAD JÚNIOR, V.; CARDOSO, J. L. C.; ROTTA, O.; ETEROVIC, A. Accidents provoked by Millipede with dermatological manifestations: report of two cases. **Anais Brasileiros Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 75, n. 4, p. 471-474, 2000.

HOFFMAN, R. L.; GOLOVATCH, S. I.; ADIS, J.; MORAIS, J. W. 5.2 Diplopoda, In: ADIS, J. (ed) *Amazonian Arachnida and Myriapoda*, Penssoft. Sofia-Moscow, p. 503-533, 2002.

HOFFMAN, R. L.; KNIGHT, L. S. A new genus and species of spirostreptoid millipeds from the Paraima mountains, British Guiana, **Journal of the New York Entomol. Soc.** LXXV, n. 1, p. 56-59, 1967.

HOFFMAN, R. L.; KNIGHT, L. S. Studies on spirostreptoid millipeds VIII supplementary notes on some brasilian species described by Otto Schubart. *Pap. Avul. de Zool.*, v. 23, n. 1, p. 1-12, 1970.

HOPKIN, S.P.; READ, H.J. **The biology of millipedes**. New York: Oxford University Press, 2 ed., 233p, 1992.

KIME, R. K.; GOLOVATCH, S. I. Trends in the ecological strategies and evolution of millipedes (Diplopoda). **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v.63, p.333-349, 2000.

KUWAHARA, Y.; ÔMURA, H.; TANABE, T. 2-Nitroethenylbenzenes as natural products in millipede defense secretion. **Naturwissenschaften**, Berlin, v.98, p.308-310, 2002.

LAWRENCE, R.F. **The centipedes and millipedes of Southern Africa: A guide**. Balkema, Cape Town, 1984, 233p.

LIMA; C. A. J.; CARDOSO, J. L. C.; MAGELA, A.; OLIVEIRA, F. G. M.; TALHARI, S.; HADDAD JUNIOR, V. Exogenous pigmentation in toes feigning ischemia of the extremities: a diagnostic challenge brought by arthropods of the Diplopoda Class ("millipedes"). **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 3, p. 391-392, 2010.

MAKAROV, S. E.; ĆURČIĆ, B. P. M.; TEŠEVIĆ, V. V.; JADRANIN, M. B.; VUJISIĆ, L. V.; ĆURČIĆ, S. B.; MANDIĆ, B. M.; SEKULIĆ, T. L.; MITIĆ, B. M. Defensive Secretions in Three Species of Polydesmids (Diplopoda, Polydesmida, Polydesmidae). **Journal Chemical Ecology**, v.36, p. 978–982, 2010.

MANTON, S. M. The evolution of arthropodan locomotory mechanisms. Part 7. Functional requirements and body design in Colobognatha (Diplopoda), together with a comparative account of diplopod burrowing techniques, trunk musculature, and segmentation. **Journal of the Linnean Society of London Zoology**, n. 44, p.383-462, 1961.

MAREK, P.; PAPAJ, D.; YEAGER, J.; MOLINA, S.; MOORE, W. Bioluminescent aposematism in millipedes. **Current Biology**, v. 21, n. 18, p. 680-681, 2011.

MEINWALD, Y. C. MEINWALD, J.; EISNER, T.; 1,2 Dialkyl-4 (3H)-Quinoxalinones in the defensive secretion of a millipede (*Glomeris marginata*) . **Science**, v. 154, p. 390-391, 1966.

MUSGRAVE A. Some arachnids and millipedes from New Guinea. **Aust. Museum Mag.**, v. 8, p.132-135, 1943.

PAVAN, M. Defensive secretion of arthropoda. **Instituto di Entomologia Agraria dell' Università di Pavia**, 1968, 235p.

ROSSI, W.; BALAZUC. J. *Laboulbeniales* parasites de Myriapodes. **Rev. Mycol.** (Paris) v. 41, p. 525-535, 1977.

ROTH, L. M.; EISNER, T. Chemical defenses of arthropods. Central Research Laboratories, United Fruit Company, Norwood, Massachusetts, Department of Entomology, Cornell University, Ithaca, New York, **Annu. Rev. Entomol.** V. 7, p. 107-136, 1962.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados: Uma Abordagem Funcional-evolutiva.** 7 ed. São Paulo. Roca, 2005. 1145p.

RONCADORI, R. W.; DUFFEY, S. S.; BLUM, M. S. Antifungal activity of defensive secretions of certain millipedes. **Mycologia**, v. 77, n. 2, p. 185-191, 1985.

SHEAR, W. A.; McPHERSON, I. S.; JONES, T. H.; LORIA, S. F.; ZIGLES, K. S. Chemical defense of a troglobiont millipede, *Tetracion jonesi* Hofman (Diplopoda, Callipoda, Abacionidae). **International Journal of Myriapodology**, v. 3, p. 153-158, 2010.

SCHUBART, O. Os myriapodes e suas relações com a agricultura. **Papéis avulsos Zool**, São Paulo, v. 2, p. 205-234, 1942.

SCHUBART, O. Os Proterospermophora do Distrito Federal(Myriapoda, Diplopoda). **Arquiv. Mus. Nac.**, Rio de Janeiro, v. 38, p.1-156, 1945.

SHELLEY, R. M. Centipedes and millipedes, with emphasis on North America fauna.Kansas School Nat. v. 45, n. 3, p. 1-15, 1999.

TAIRA, J.; NAKAMURA, K.; HIGA, Y. Identification of secretory compounds from the millipede, *Oxidus gracilis* C. L. Koch (Polydesmida: Paradoxosomatidae) and their variation different habitats. **Appl. Entomol. Zool.**,v. 38, n. 3, p. 401-404, 2003.

TIEMANN, DARWIN L.Investigation on the Distribution of Luminous Species of Millipedes in California.**Year Book, Amer. Philos. Soc.**p. 353-354, 1964.

TIEMANN, D.L. Observations on the natural history of the western banded glowworm *Zarhipis integripennis* (Le Conte) (Coleoptera: Phengodidae). **Proc. Calif. Acad. Sci.** v. 35, p. 235-264, 1967.

VALDERRAMA, X.; ROBINSON, J. G.; ATTYGALLE, A. B.; EISNER, T. Seasonal anointment with millipedes in a wild primate: a chemical defense against insects?. **J. Chemic. Ecol.**, New York, v.26, n.12, p.2781-2789, 2000.

WELDON, P. J.; ALDRICH, J. R.; KLUN, J. A.; OLIVER, J. E.; DEBROUN, M. Benzoquinones from millipedes deter mosquitoes and elicit self-anointing in capuchin monkeys (*Cebus spp.*). **Naturwissenschaften**, v. 90, p. 301-304, 2003.

WOODRING, J. P.; BLUM, M. S. The anatomy, physiology and comparative aspects of the repugnatorial glands of *Orthocricus arboreus* (Diplopoda: Spirobolida). **J. Morphol.**v. 116, p. 99-108, 1965.

WU, X.; BUDEN, D. W.; ATTYGALLE, A. B. Hydroquinones from defensive secretion of a giant Pacific millipede, *Acladocricus setigerus* (Diplopoda: Spirobolida). **Chemoecology**, v. 17, p. 131–138, 2007.

### 3. OBJETIVOS

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo geral estudar a morfologia e o conteúdo das glândulas de defesa da espécie *U. atrobrunneus*.

Os objetivos específicos foram:

- Analisar a ultramorfologia, a histologia e a ultraestrutura da glândula de defesa com a finalidade de descrever a conformação da glândula e as células que a compõem;
- Realizar testes histoquímicos por meio de técnicas que detectem a presença de proteínas, polissacarídeos, cálcio e lipídeos;
- Realizar a análise dos compostos voláteis da secreção defensiva do milípede por meio da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

Uma vez que a espécie vem se tornando uma provável “praga” em centros urbanos do estado de São Paulo, acredita-se que esta pesquisa possa fornecer subsídios para o melhor conhecimento da biologia da espécie *U. atrobrunneus*.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

Indivíduos adultos de *U. atrobrunneus* foram coletados na cidades de Rio Claro, São Paulo. Os animais foram mantidos em terrário contendo terra e folhiço, umedecidos periodicamente. As glândulas de defesa foram obtidas por dissecação dos espécimes anestesiados, realizada em placas de dissecação contendo solução fisiológica.

Os métodos consistiram em:

### **4.1 Ultramorfologia**

#### **Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

O material foi fixado em solução Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) durante 24 horas e desidratadas em acetona 50, 75, 90, 95 e 100% durante 5 minutos cada banho, o último repetido por três vezes. As peças foram transferidas para vidros até que estivessem secas e em seguida, o material foi colado em suportes metálicos (stubs) para que pudessem então ser analisado ao microscópio eletrônico de varredura de baixo vácuo, HITACHI TM3000 e fotografado.

### **4.2. Histologia**

Foi utilizada a técnica de inclusão em resina (historesina) para estudos histológicos e histoquímicos. Para isso, as glândulas de defesa foram fixadas em solução Bouin, paraformaldeído 4% e formolcálcio durante aproximadamente 24 horas em geladeira, de acordo com a técnica utilizada. Em seguida foram desidratadas em álcool 70, 80, 90, e 95% durante 30 minutos cada banho, e então transferidas para uma solução de resina de embebição Leica, durante 24 horas, mantido em geladeira. As glândulas foram colocadas em moldes preenchidos com resina de inclusão. Em seguida, o material foi seccionado com auxílio do micrótomo Leica (Modelo: RM 2245); as secções foram hidratadas e recolhidas em lâminas. Depois de secas, essas lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) conforme rotina histológica.

### **4.3. Histoquímica**

#### **4.3.1. Proteínas Totais**

##### **Azul de Bromofenol (PEARSE, 1985)**

Fixação do material em paraformaldeído 4% e/ou solução Bouin, coloração pela solução de azul de bromofenol à temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora;

lavagem dos cortes em água e banho em ácido acético 0,5% por 5 minutos; passagem em álcool butílico terciário.

#### **4.3.2. Polissacarídeos**

##### **Técnica do PAS (Ácido Periódico Schiff) - Polissacarídeos neutros (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)**

Fixação em solução Bouin; oxidação por 10 minutos em ácido periódico 0,4%; reação no reativo de Schiff por aproximadamente 1 hora no escuro; deixar em água sulfurosa por 3 minutos; lavar em água corrente por 3 minutos.

##### **Técnica simultânea PAS e azul de Alcian – Polissacarídeos neutros e ácidos (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)**

Fixação em solução Bouin; passar o material em água destilada; corar com Alcian (pH= 2,5) por 30 minutos; lavar em água destilada; oxidação por 5 minutos em ácido periódico 1%; lavar em água destilada; reação no reativo de Schiff por 30 minutos no escuro; deixar em água sulfurosa por 1 minuto; lavar em água corrente por 3 minutos.

#### **4.3.3. Lipídios**

##### **Sudan Black B - Lipídios neutros (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)**

Fixação em formolcálcio; coloração pelo sudan black B por 15 minutos; lavagem em água destilada e em álcool 70%; em seguida montagem das lâminas em gelatina glicerinada.

##### **Azul do Nilo - Lipídios neutros e ácidos (LISON, 1960).**

Fixação em formolcálcio; coloração pelo azul do Nilo por 5 minutos à temperatura de 37°C; lavagem em água corrente; banho em ácido acético 1% por 1 minuto; em seguida montagem da lâmina em gelatina glicerinada.

#### **4.3.4. Cálcio**

##### **Método de von Kossa (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)**

Fixação em paraformaldeído 4% ou solução Bouin; imersão dos cortes em nitrato de prata por 20 minutos; lavagem em água e transferência dos cortes para revelador D-75; imersão em fixador F-5 por 5 minutos.

#### **4.4 Ultra-estrutura**

##### **Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

As glândulas de defesa foram fixados em glutaraldeído 2,5%, em tampão cacodilato 0.1M a 4° C, lavados em tampão cacodilato e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas. Novamente foram lavadas no mesmo tampão, colocadas em álcool 10% por 15 minutos e contrastado com acetato de uranila 2% em álcool 10% por 4 horas. Em seguida, foi feita uma desidratação em série crescente de acetona, submetido à solução resina: acetona (1:1) por 12horas, embebido em resina Epon-araldite com catalisador por 24 horas e levado pra estufa a 70° C por 24 horas para a polimerização da resina. O material foi seccionado em ultramicrótomo e as grades obtidas foram contrastadas e observadas ao microscópio eletrônico de transmissão Phillips CM 100.

## 5. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados na forma de artigos científicos, os quais serão submetidos às revistas especializadas da área.

**- ARTIGO 2: Análise morfológica das glândulas de defesa do diplópodo *Urostreptus atrobrunneus***

Autores: Cristina Moreira de Sousa, Lucilene Delazari dos Santos, Carmem Silvia Fontanetti

**- ARTIGO 3: Secreção defensiva do milípede sinantrópico *Urostreptus atrobrunneus* (Spirostreptidae)**

Autores: Cristina Moreira de Sousa, Sebastião Zano Filho, Marcela Paula Silva, Lucilene Delazari dos Santos, Carmem Silvia Fontanetti

Submetido à revista “Journal of Chemical Ecology”

**ARTIGO 2****Análise morfológica das glândulas de defesa do diplópodo *Urostreptus atrobrunneus***

**Cristina Moreira de Sousa<sup>1</sup>, Lucilene Delazari dos Santos<sup>2</sup>, Carmem Silvia Fontanetti<sup>3</sup>**

**Departamento de Biologia – Instituto de Biociências, Rio Claro, SP, Brasil.**

**Av. 24-A, 1515, CEP: 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil**

**1: [cris.sousa.bio@hotmail.com](mailto:cris.sousa.bio@hotmail.com); 2: [lucilene@cevap.org.br](mailto:lucilene@cevap.org.br); 3: [fontanet@rc.unesp.br](mailto:fontanet@rc.unesp.br)**

**Resumo**

Os milípedes são macro-artrópodes de solo que representam um papel imprescindível na manutenção do ecossistema; alteram a natureza física do solo ao passo que, aumentam a porosidade, a retenção de água e influenciam no processo de transporte de nutrientes. São animais que não apresentam populações numerosas, no entanto mudanças climáticas, utilização de pesticidas e desequilíbrios ambientais podem ocasionar explosões populacionais; possuem poucos predadores, devido ao seu exoesqueleto resistente e à presença de glândulas de defesa ao longo do corpo, que secretam substâncias voláteis, na medida em que esses animais são incomodados. O milípede *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi & Fontanetti, 2006, apresentou alguns pontos de infestação em centros urbanos do estado de São Paulo, Brasil, causando incômodos à população humana. O fato de se tratar de uma espécie sinantrópica, torna-se necessário compreender o funcionamento de seu meio químico de defesa. Com o intuito de contribuir para um melhor conhecimento desta potencial “praga”, este trabalho apresenta as análises ultramorfológicas, histológicas, histoquímicas e ultraestruturais das glândulas de defesa do milípede *U. atrobrunneus*. Por meio das análises foi possível observar que as glândulas de defesa desta espécie é do tipo 2, segundo a classificação de Eisner et al. (1978) para glândulas de defesa de milípedes. Este tipo é formado por um saco esférico denominado vesícula glandular, região correspondente ao reservatório da glândula, e um ducto que conduz a secreção até o poro localizado na lateral do corpo do milípede, comumente encontrada em

representantes da ordem Spirostreptida, a qual pertence a espécie *U. atrobrunneus*. A glândula é revestida internamente por uma espessa cutícula, atestando sua origem ectodérmica, esta apresenta grande quantidade de canais-poros. O epitélio glandular é formado por dois tipos de células secretoras, segundo classificação de Noirot e Quennedy (1974, 1991) definidas para glândulas de insetos: as células pertencentes à classe 1, caracterizada pela presença de microvilosidades na face apical; e as pertencentes à classe 3, caracterizadas pela presença de canalículos no citoplasma. Ao redor da glândula encontra-se uma musculatura bem desenvolvida e a presença do corpo gorduroso parietal.

**Palavras-chave:** Spirostreptidae, defesa química; estrutura glandular, histologia, MEV, MET.

## 1. Introdução

Os diplópodos são considerados artrópodes importantes na dinâmica do solo, provocando maior aeração e enriquecimento da matéria orgânica nele presente. De acordo com Bueno-Villegas et al. (2004) os diplópodos são um dos principais componentes da fauna do solo envolvidos com a formação do mesmo, e representam uma considerável importância ecológica para desagregação de detritos, dentro do ciclo de decomposição. Estes animais afetam a decomposição por meio da fragmentação e da inoculação da matéria orgânica com esporos de bactérias e fungos, e finalmente convertem a matéria orgânica em húmus (BLOWER, 1995; DANGERFIELD, 1990).

Diplópodos geralmente não apresentam população numerosa, no entanto, é encontrada na literatura uma série de relatos sobre algumas espécies que apresentaram explosões populacionais, normalmente ocasionadas por desequilíbrios ambientais (CLOUDSLEY-THOMPSON, 1949; NIJIMA; SHINOHARA, 1988; BOCCARDO et al., 1997, 2002; KANIA; TRACZ, 2005; FONTANETTI et al., 2010). O milípede *Urostreptus atrobrunneus* é uma espécie que chamou atenção de pesquisadores diante da alta proliferação que apresentou em alguns centros urbanos no estado de São Paulo (BOCCARDO, 1998; FONTANETTI et al., 2007).

São animais que apresentam poucos inimigos naturais e isso ocorre em virtude dos mecanismos de defesa que apresentam, os quais podem ser físicos e químicos (MEINWALD et al., 1966). Fisicamente os diplópodos dispõem: 1) de uma barreira tegumentar, pois seu exoesqueleto é impregnado por sais de cálcio, o que os tornam

muito resistentes e praticamente impalatáveis; 2) do comportamento de enrolar-se, de modo a formar uma espiral ou uma esfera perfeita conforme a espécie (HOPKIN; READ, 1992); 3) de movimentos violentos, como serpente, na tentativa de escapar; 4) do ato de defecar quando irritados (LAWRENCE, 1984); 5) a emissão de cerdas rígidas localizadas na extremidade posterior, em direção ao predador, como ocorre com membros do grupo *Penicillata* (SHELLEY, 1999). Quimicamente, as defesas dos diplópodos podem ser: 1) a coloração aposemática; 2) a bioluminescência; 3) as glândulas de defesa, também conhecidas como glândulas repugnatórias (HOPKIN; READ, 1992; RUPPERT et al., 2005).

As glândulas de defesa merecem destaque devido à diversidade de compostos que podem ser encontrados em seu conteúdo. Muitos experimentos conduzidos em laboratório demonstraram que as secreções defensivas dos milípedes são eficazes contra uma ampla gama de predadores (HOPKIN; READ, 1992).

Hopkin e Read (1992) sugerem que as glândulas de defesa dos milípedes tenham evoluído com estímulos dos predadores. Os autores acreditam que provavelmente a chegada de formigas proporcionou uma pressão seletiva para a evolução das glândulas de defesa; concluem ainda que para algumas espécies, a secreção fornece uma defesa eficaz, mas para outros predadores não, uma vez que ainda são capazes de utilizar de estratégias que permitem predação os milípedes, sem que estes consigam se defender. A capacidade de algumas espécies tropicais de ejetarem suas secreções por distâncias consideráveis torna improvável o fato de que as glândulas de defesa tenham evoluído em resposta somente a predadores invertebrados (HOPKIN; READ, 1992).

A descrição morfológica das glândulas de defesa dos milípedes é fundamental não só para classificação dos grupos taxonômicos como para identificação das espécies. Milípedes pertencentes à mesma família possuem o aparelho glandular semelhante, no entanto, a composição da secreção presente nas glândulas de defesa pode diferir significativamente (WU et al., 2007).

Eisner et al. (1978) reconheceu três tipos morfológicos de glândulas de defesa em milípedes: Tipo 1: cada glândula é envolta por uma rede de músculos que forçam a secreção para fora através das aberturas, a secreção é emitida no aspecto de gotas pegajosas, ocorre em *Glomerida*; Tipo 2: esta glândula consiste de uma saco esférico, contendo células secretoras, o qual se abre na superfície lateral do milípede através de um poro, está presente na maioria das ordens incluindo *Spirobolida*, *Spirostreptida*,

Julida, Callipodida, Platydesmida e Polyzoniida; Tipo 3: encontrado exclusivamente em Polydesmida; as glândulas de defesa apresentam dois compartimentos, no interior do compartimento menor aloja-se mandelonitrila, enquanto que no outro (o qual é separado por uma válvula) está contida uma enzima que catalisa a quebra de mandelonitrila em cianeto de hidrogênio e benzaldeído; o conteúdo destas câmaras é produzido por células secretoras especializadas, as quais podem ser encontradas nas paredes destas câmaras.

Além de classificar os milípedes de acordo com o tipo de glândula de defesa que possuem, é possível também classificá-los de acordo com as substâncias que secretam. Por exemplo, benzoquinonas são substâncias características das ordens Julida, Spirobolida e Spirostreptida; milípedes que ejetam fenóis são pertencentes à ordem Callipodida; os que emitem compostos cianogênicos representam a ordem Polydesmida; quinazolinonas à ordem Glomerida; alcalóides à ordem Polyzoniida (EISNER et al., 1996).

Diante do fato da espécie *U. atrobrunneus* ser considerada uma provável “praga” em centros urbanos do estado de São Paulo e apresentar um íntimo contato com a população humana, uma análise detalhada de suas glândulas de defesa, torna-se imprescindível para um melhor conhecimento da espécie. E virtude disso, o objetivo deste trabalho foi descrever a morfologia da glândula de defesa do milípede por meio das técnicas histológica, histoquímicas e ultraestrutural.

## **2. Material e métodos**

Foram coletados indivíduos adultos de *U. atrobrunneus* nos arredores da cidade de Rio Claro, São Paulo, Brasil. Os animais foram mantidos em terrário contendo terra e folhiço, umedecidos periodicamente. As glândulas de defesa foram obtidas por dissecação dos espécimes anestesiados, feita em placas de dissecação contendo solução fisiológica.

O material processado para microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi fixado em solução Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) durante 24 horas, e desidratado em acetona 50, 75, 90, 95 e 100% durante 5 minutos cada banho, sendo este último repetido por três vezes. O material foi transferido para suportes metálicos (stubs), analisado e fotografado ao microscópio eletrônico de varredura de baixo vácuo, HITACHI TM3000.

Para os estudos histológicos e histoquímicos foi utilizada a técnica de inclusão em resina (historesina). As glândulas de defesa foram fixadas em solução Bouin, paraformaldeído 4% e formolcálcio dependendo da técnica aplicada. O material foi incluído em historesina e corado com hematoxilina/eosina para análise histológica.

Os testes histoquímicos aplicados foram: Azul de Bromofenol (PEARSE, 1985) para detecção de proteínas; técnica do Ácido Periódico-Schiff (PAS) e técnica simultânea PAS e Azul de Alcian (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) para polissacarídeos; técnica de von Kossa (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) para cálcio e Azul do Nilo (LISON, 1960) e Sudan Black B (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) para lipídios.

O material processado para microscopia eletrônica de transmissão foi fixado em glutaraldeído 2,5%, em tampão cacodilato 0.1M a 4° C, lavados em tampão cacodilato e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas; foi então novamente lavado no mesmo tampão, colocado em álcool 10% por 15 minutos e contrastado com acetato de uranila 2% em álcool 10% por 4 horas; após este procedimento foi feita uma desidratação do material em série crescente de acetona, submetendo-o à solução resina: acetona (1:1) por 12 horas; o mesmo foi embebido em resina Epon-araldite com catalisador por 24 horas e levado para estufa a 70° C por 24 horas para a polimerização da resina. O material foi seccionado em ultramicrotomo e as grades obtidas foram contrastadas e observadas ao microscópio eletrônico de transmissão Phillips CM 100.

### **3. Resultados**

#### **3.1. Ultramorfolgia**

Durante a dissecação foi possível observar os poros das glândulas de defesa de *U. atrobrunneus* a partir do 6° diplossegmento, estando presente até o penúltimo. Observou-se também que a coloração da glândula é extremamente escura, provavelmente pela natureza da secreção.

As glândulas de defesa de *U. atrobrunneus* encontram-se dispostas na lateral do corpo do animal (Fig. 1A) e sua conformação consiste em um saco esférico, ou vesícula glandular, dotado de um canal, ou ducto, ao qual está conectado ao tegumento por um poro onde ocorre a liberação da secreção (Figs. 1A, C, D); elas ocorrem aos pares no

diplossegmento. Observou-se que há muitos feixes de fibras musculares que envolvem as glândulas (Fig. 1A, B).

Na análise ao microscópio eletrônico de varredura observou-se que, externamente, a superfície da glândula é irregular (Fig. 1D).

### 3.2 Histologia

Nos cortes histológicos confirma-se o formato da glândula (Fig. 2A), com a região referente à vesícula glandular e ducto ou canal.

A vesícula glandular possui uma parede espessa formada por células glandulares de citoplasma heterogêneo dotado de muitos vacúolos (Figs. 2B, C); os núcleos são irregulares aparentemente por pressão dos vacúolos citoplasmáticos e possuem limites pouco definidos (Fig. 2B). Foi possível observar canaliculos por entre as células da porção glandular (setas nas Figs. 2B, C).

Internamente, a vesícula glandular é dotada de uma cutícula bastante espessa (Figs. 2B, C, D); na qual pode se observar a presença de inúmeros canais, que provavelmente representam os canais-poro (setas nas Fig. 2D). Ao redor da glândula observou-se o íntimo contato do corpo gorduroso parietal (Fig. 2F), além de uma musculatura bem desenvolvida (Fig. 2E).

O ducto da glândula é formado por um epitélio pavimentoso simples (Fig. 2F), também revestido internamente por uma cutícula.

### 3.3 Histoquímica

As análises histoquímicas demonstram que no epitélio que reveste o reservatório da glândula de defesa existem células que reagem de modos diferentes à técnica para detecção de proteínas, demonstrando que este epitélio é claramente composto por dois tipos celulares; observa-se que há células que se coram mais fortemente pela técnica, as quais se encontram na região periférica (Figs. 3A, B), enquanto que outras se coram mais fracamente, localizadas preferencialmente mais próximas à cutícula (Figs. 3A, B).

Na região do ducto da glândula observa-se que a cutícula do ducto é fortemente positiva para detecção de proteínas, enquanto que o epitélio que o reveste reage fracamente à técnica (Fig. 3C).

A detecção de cálcio permite observar que existem esferocristais no epitélio glandular (Figs. 3D, E). Muitos desses esferocristais não se mantiveram no material e foram removidos pela microtomia, resultando em inúmeros espaços vazios observados.

As células da porção glandular e do ducto não apresentam polissacarídeos e nem lipídeos neutros e ácidos.

### 3.4 Ultraestrutura

A análise ultraestrutural possibilitou uma caracterização mais detalhada da morfologia das células da vesícula glandular e o ducto, bem como da cutícula que reveste internamente esta estrutura.

A vesícula glandular apresenta-se composta por células glandulares dotadas de citoplasma heterogêneo. Estas células encontram-se apoiada numa espessa lâmina basal (Figs 4A, B, C, E); os limites celulares são imprecisos e as junções celulares são do tipo interdigitações (Fig. 4A). Os núcleos apresentam morfologia irregular (Fig. 4D).

A presença de células de citoplasma claro e escuro, observadas na detecção de proteínas é condizente ao encontrado na ultraestrutura; as células, com citoplasma claro, apresentam-se quase que totalmente preenchidas por esferocristais, sendo a maioria removida durante a preparação do material ou durante a microtomia, resultando em muitos espaços vazios (Figs. 4A, B, C, D, F). Estas correspondem às células pertencentes à classe 1, segundo a classificação dada para células glandulares de insetos (NOIROT; QUENNEDY, 1991), as quais são caracterizadas pela presença de microvilosidades na face apical (Figs. 4B, 5A, B, C)) As células com citoplasma escuro são as que apresentam vesículas proteicas (Fig. 4C). Por entre as células são observados canalículos (Figs. 4E, F), atestando que estas pertencem à classe 3 (NOIROT; QUENNEDY, 1991). A presença dos canalículos sugere que ocorram duas células conectadas, uma célula secretora e uma célula canal; a célula que secreta o canal se comunica com a região receptora da célula secretora através de inúmeras microvilosidades (Figs. 4E, F). Esta estrutura responsável pela junção entre a célula secretora e a célula canal também pode ser denominada “end apparatus”, porém encontra-se num diferente grau de desenvolvimento, formado pelo canal receptor que apresenta uma cutícula interna interrompida e está circundado por microvilosidades (Fig. 5A).

São observadas várias mitocôndrias e regiões de retículo endoplasmático rugoso, distribuídos pelo citoplasma das células (Figs. 4B, D, E, F).

A vesícula glandular é provida internamente de uma cutícula bastante espessa, (Figs. 4B; 5A, B, C, D); é possível observar no espaço subcuticular a presença de canais das células classe 3 (Figs. 5B, C), bem como a deposição de várias figuras mielínicas no espaço subcuticular (Fig. 5B).

A cutícula da glândula de defesa apresenta mais externamente uma fina camada eletrondensa e outra mais eletrólucida (Figs. 5A, B, C, D). Na camada mais superficial observa-se a ocorrência de inúmeros canais-poros (Fig. 5D), os quais possuem cerca de 14,95 nm de diâmetros, por onde ocorre a passagem de material secretado em direção ao lúmen (Fig. 5D).

O ducto da glândula apresenta um epitélio composto por células dotadas de núcleos achatados, constituindo um epitélio pavimentoso, apoiado numa fina lâmina basal, unidas por intergirditações; o citoplasma destas células é preenchido por inúmeros esferocristais (Fig. 5E). A cutícula do ducto da cutícula apresenta basicamente a mesma constituição encontrada na vesícula glandular (Figs. 5E, F).

#### 4. Discussão

A presença de glândulas de defesa em milípedes é algo bastante comum, exceto na subclasse Penicillata e nas ordens Sphaerotheriida e Chordeumatida (EISNER et al., 1978); são glândulas que ocorrem aos pares por diplossegmento (HOPKIN; READ, 1992). Em *U. atrobrunneus*, as glândulas de defesa surgem a partir do sexto diplossegmento e estão presentes até o final do corpo.

De acordo com a classificação específica para glândula de defesa de diplópodos proposta por Eisner et al. (1978), existem três tipos de glândulas de defesa; diante de suas descrições, a ordem Spirostreptida possui o tipo 2, a qual consiste em uma estrutura muito simples, um saco glandular dotado de um ducto. Esta estrutura se abre na superfície lateral do milípede por meio de um pequeno poro; estes ficam fechados em circunstâncias normais, porém quando o animal se sente ameaçado estas glândulas são estimuladas e descarregam seu conteúdo, a partir da contração do músculo que se encontra ligado ao ducto.

Esta morfologia foi observada em *U. atrobrunneus*, um espirostreptídeo, ou seja, foi observado um saco esférico, que representa a região denominada vesícula glandular

e um ducto, o qual se abre num poro na lateral do corpo do animal, sendo, portanto, uma glândula pertencente ao tipo 2.

Eisner et al. (1978) descreveram ainda, que aparentemente, este saco não é circundado por músculo, logo a emissão da secreção, provavelmente ocorre devido ao aumento de pressão da hemolinfa. Ao contrário do que os autores propuseram para as glândulas do tipo 2, em que a vesícula glandular não é circundada por músculo, a glândula de defesa de *U. atrobrunneus*, apresentou uma musculatura bastante desenvolvida ao redor de toda sua extensão, incluindo o ducto.

Os estudos realizados por Barth (1967) com as glândulas de defesa de *Rhinocricus padbergi* demonstraram que na descrição anatômica do aparelho glandular, este se apresenta como sendo uma invaginação do integumento; o epitélio glandular apresentou formação homóloga à hipoderme, comprovado pela presença de um revestimento cuticular e de pigmentos nas células de todo aparelho. O sistema de defesa compõe-se de uma vesícula glandular, de um canal condutor e de um dispositivo de fechamento. Em *U. atrobrunneus*, a glândula de defesa apresentou-se semelhante com a descrição feita para espécie *R. padbergi*.

Os estudos realizados com a morfologia de glândulas de defesa de diplópodos são escassos, por esta razão faz-se necessário a comparação destas glândulas com os estudos realizados com as glândulas de insetos, visto que os animais desta classe apresentam muitas semelhanças com a classe Diplopoda.

A cutícula é uma secreção das células epidérmicas e cobre todo o exterior do corpo de insetos, formando o exoesqueleto, bem como delimita a luz de todos os órgãos de origem ectodérmica, tais como o estomodeo, proctodeo, as traquéias e as glândulas ectodérmicas (CRUZ-LANDIM, 2009; CHAPMAN, 1998). Do mesmo modo, esta informação se aplica para outros artrópodes, uma vez que ambos compartilham destas mesmas características, e confirma os resultados observados neste trabalho, uma vez que foi possível visualizar que a constituição da glândula de defesa apresenta em seu interior uma espessa camada de cutícula, demonstrando que esta é uma glândula de origem ectodérmica, ou seja, que esta glândula originou-se de uma invaginação epidérmica.

Cruz-Landim (2009) descreveu que em abelhas, os canais-poro são muito numerosos na cutícula que recobre regiões glandulares da epiderme e servem para eliminação da secreção. Sugere-se que os inúmeros canais visualizados na cutícula da

glândula de defesa de *U. atrobrunneus* possam ser canais-poro e que estejam relacionados a eliminação da secreção da glândula, uma vez que estão presentes por toda extensão da cutícula.

As células epidérmicas podem ser consideradas glandulares na medida em que são responsáveis pela síntese da cutícula, dos componentes da membrana basal, das enzimas, etc. Algumas regiões se especializam para constituir glândulas variadas, cujas células produzem substâncias especiais. Diante disso, Noirot e Quenedey (1974, 1991) classificaram as células glandulares em três classes:

Classe 1: as modificações do tegumento são pequenas, as glândulas constituídas por esta classe de células constam de regiões onde as células epidérmicas se encontram hipertrofiadas, recobertas por uma cutícula, sem ou com pequenas modificações, destinadas à eliminação da secreção; esta é geralmente eliminada pelos canais-poro.

Classe 2: as células propriamente glandulares não apresentam contato direto com a cutícula e estão intimamente apostas ou embutidas em regiões hipertrofiadas da epiderme; a célula secretora é um enócito e a secreção é passada deste para a célula epidérmica e, através desta, eliminada pelos canais-poro da cutícula.

Classe 3: as células secretoras localizam-se abaixo do tegumento, afastadas deste, mas a ele conectadas por um canal excretor, estas células são geralmente esféricas e têm o citoplasma percorrido por uma invaginação da membrana plasmática que forma um canal coletor da secreção revestido por cutícula, localizado em uma área denominada espaço secretor, delimitado pela membrana plasmática invaginada. Este canal, aparentemente intracelular, está conectado ao canal excretor que liga a célula secretora ao tegumento; o canal excretor é também formado por uma célula epidérmica modificada e tem a luz revestida por cutícula.

Quenedey (1998) descreveu a ultraestrutura e a morfogênese das classes de células epidermais de insetos. Neste trabalho, o autor relatou que há uma grande variabilidade na organização das células da classe 3. A cutícula secretada pelas células classe 3, independentemente do número de células que formam a unidade glandular, forma um ducto de cutícula, que liga a célula mais interna da unidade com a cutícula externa. O ducto cuticular tem duas partes: uma corresponde ao canal receptor localizado no espaço extracelular da célula secretora, delimitada por microvilosidades, onde a secreção é armazenada e o canal de condução envolto por uma ou mais células externas. O canal de condução é geralmente envolto por um canal celular, mas pode ser

uma célula epidérmica comum. Tal célula epidérmica é, de fato, um canal celular verdadeiro. Em muitos casos, duas células para o canal são dispostas ao longo do canal condutor que mantém o mesmo diâmetro em todo o seu comprimento. A célula mais interna é considerada secretora quando microvilosidades estão presentes em todo o canal condutor. O canal receptor é geralmente um simples prolongamento do canal de condução, com a mesma forma e diâmetro. Às vezes, é composto por um único tubo perfurado, é geralmente formado de epicutícula interrompida no interior, dispostas em uma ou mais camadas. Quando várias camadas estão presentes no canal a aparência é esponjosa.

Cruz-Landim e Abdalla (2002) em seus trabalhos sobre as glândulas exócrinas de abelhas mencionaram que, na classe 3, as células secretoras geralmente não se encontram incorporadas a epiderme, embora sejam originadas dela; a célula secretora destacada da epiderme, é geralmente esférica e provida de um canal que a liga a um poro na cutícula por onde a secreção é descarregada. Esta célula apresenta um mecanismo complexo de descarga da secreção, pois sua membrana plasmática produz uma invaginação, a qual cria um espaço, aparentemente intracelular, por onde a célula secreta uma cutícula; este espaço na maioria das vezes toma a forma de um canalículo, que aparentemente percorre todo o citoplasma da célula e tem sido denominado canalículo intracelular, embora topologicamente esteja fora da célula. A membrana plasmática que limita este espaço pode apresentar microvilosidades ou invaginações tubulares que formam um labirinto peri-canalicular.

Portanto, canalículo, canal intracelular, canal coletor, ampola e aparato terminal (“end apparatus”), são designações encontradas em vários trabalhos para se referir à mesma estrutura, embora elas possam apresentar diferentes graus de desenvolvimento (CRUZ-LANDIM; ABDALLA, 2002). Diante dessas informações, sugere-se que a glândula de defesa do milípede *U. atrobrunneus* é composta por células glandulares pertencentes à classe 3, apresentando o canalículo em seus diferentes graus de desenvolvimento, conforme as descrições encontradas na literatura.

As células glandulares classe 3 foram observadas em diversos trabalhos com diferentes espécies, como por exemplo, Billen et al. (1999) que descreveu a glândula pigidial da formiga *Aenictus alticola*, Cruz-Landim e Abdalla (2002) que descreveram a glândula intramandibular da abelha *Oxytrigona tataíra*, Costa-Leonardo et al. (2009) em seu trabalho com glândulas mandibulares do cupim *Coptotermes gestroi*, Vieira et

al. (2012) na descrição da glândula metapleural da formiga *Atta laevigata*, demonstrando que as células glandulares do milípede *U. atrobrunneus* também compartilha das descrições utilizadas para outros grupos de artrópodes.

Cruz-Landim (2009) descreveu que na organização das glândulas de cera dos meliponíneos que apresentavam células glandulares da classe 1, foi observado que a porção apical das células é ocupada por um labirinto de espaços formados por invaginações da membrana plasmática apical das células; estes espaços e o espaço subcuticular que se forma entre as células e a cutícula que as recobre aparecem preenchidos por secreção; assim que passa a fase em que a operária produz cera, o epitélio glandular regride e volta a apresentar o aspecto comum à epiderme do restante do corpo da abelha. Do mesmo modo, nas análises ultraestruturais da glândula de defesa de *U. atrobrunneus* também foram visualizados labirintos formados na região apical das células da vesícula glandular, atestando que as células que o compõem são pertencentes à classe 1, segundo as descrições existente para insetos; e no espaço subcuticular, observou-se a formação de figuras mielínicas, provavelmente conduzidas até esta região pelas invaginações da membrana citoplasmática apical .

De acordo com Cruz-Landim (2009) as figuras mielínicas provavelmente são resultantes do processo de degeneração e autodigestão. Existe uma explicação que se aplica para os enócitos (células de origem ectodérmica), a qual diz que a morfologia dos grânulos que se acumulam nos enócitos das abelhas mais velhas é compatível tanto com uma secreção de natureza hidrocarbônica como lipídica; é compatível também com a estrutura muitas vezes observada em resíduos não digeridos resultantes de auto ou heterofagias celulares, as figuras mielínicas.

Deste modo, existe a hipótese de que as figuras mielínicas observadas na região subcuticular da vesícula glandular de *U. atrobrunneus*, possam ser uma secreção de natureza hidrocarbônica, visto que a secreção defensiva do milípede é composta basicamente por hidrocarbonetos (benzoquinonas e benzaldeídos).

A ultraestrutura da glândula intramandibular da abelha *M. quadrifasciata*, demonstrou que no citoplasma desta célula havia muitas mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e secreção sob a forma de grânulos eletrondensos, sugerindo composição protéica ou glicoproteica (CRUZ-LANDIM, 2009). A presença de grânulos protéicos também foi observada na vesícula glandular de *U. atrobrunneus*, além da

presença de mitocôndrias e de retículo endoplasmático rugoso, o que sugere a participação de compostos protéicos na composição da secreção defensiva do milípede.

A observação das células epiteliais da vesícula glandular de *U. atrobrunneus* com citoplasma mais claro (classe 1) e outras com citoplasma mais escuro (classe 3) indica que possivelmente estas células estejam envolvidas com a produção das diferentes substâncias que irão compor o conteúdo final da secreção defensiva do milípede. O fluido defensivo deste animal apresenta-se formado por compostos voláteis, mas também por compostos que permanecem numa fase liquefeita, e deste modo pressupõe-se que estas células realizem a produção de ambas substâncias, além de armazená-las.

A formação de esferocristais, corpos mineralizados, ou corpos concêntricos, como denominam alguns autores, é algo bem estabelecido em vários filos de invertebrados; são estritamente de base mineral e podem ser produzidos por diferentes órgãos. O acúmulo de minerais nos esferocristais é um mecanismo importante para manutenção da homeostase do organismo; os insetos possuem várias estruturas com essa função, incluindo esferocristais e grânulos que contêm minerais ou elementos ricos em purina. Vários tipos de esferocristais também foram encontrados em Mollusca e Crustacea (HUBERT, 1975; 1979); o acúmulo observado em todos esses casos revela um processo de equilíbrio iônico, o qual envolve processos fisiológicos como reciclagem, armazenamento e excreção de minerais.

Os corpos mineralizados, corpos concêntricos ou esferocristais são corpos esféricos que apresentam organização estrutural variada; podem consistir de várias camadas concêntricas de material amorfo ou podem ser envoltos por uma camada de material elétron-denso intimamente associado à membrana circundante (FONTANETTI et al., 2006). De acordo com Hubert (1979) estas estruturas comumente ocorrem como esferitos ou grânulos em Diplopoda. Kölher et al. (1995) utilizaram o termo esférito para designar inclusões de metal nas células e para distinguir entre os tipos de grânulos de acordo com sua composição química.

No citoplasma das células da vesícula glandular do milípede *U. atrobrunneus* foram observados esferocristais, os quais muitos foram removidos durante o processamento e a microtomia do material, resultando em espaços vazios; os que se mantiveram apresentavam um tipo de material alojado no centro. Visto isso, algumas

hipóteses sobre o conteúdo desses esferocristais podem ser sugeridas, uma vez que apresentam formas bem características de alguns esferocristais descritos na literatura.

Segundo Locke (1984), os esferocristais de urato que ocorrem no corpo gorduroso das baratas, também conhecidos como urócitos, apresentam-se envoltos por uma membrana; esses vacúolos possuem um córtex de material fibroso e um núcleo composto de material semelhante ao do córtex; o urato não é preservado durante o processamento do tecido para análise morfológica, pois ocupa a área mais clara entre o núcleo e o córtex; a origem destes vacúolos com urato não é bem estabelecida, mas todos se apresentam circundados por finas membranas semelhantes à membrana plasmática.

Fontanetti et al. (2006) descreveram a presença de esferocristais de cálcio no corpo gorduroso e no intestino médio do milípede *Rhinocricus padbergi*; são estruturas com uma disposição concêntrica de material, que consiste principalmente de carbonato de cálcio. Crane e Crowden (1968) descreveram que os esferocristais são compostos conjugados de uma matriz orgânica com sais de cálcio cristalizado, formando corpos com anéis concêntricos. Petit (1970) mostrou que esses corpos concêntricos são compostos principalmente de fosfato e carbonato de cálcio associados a uma rede de proteínas, que ficam acumulados nas cisternas do retículo endoplasmático rugoso.

Sendo assim, sugere-se que os esferocristais encontrados nas células da vesícula glandular de *U. atrobrunneus*, podem apresentar diferentes conteúdos. Alguns dos esferocristais apresentaram a morfologia descrita para estruturas com urato (LOCKE, 1984; FONTANETTI et al., 2006); outros apresentaram a morfologia típica de esferocristais que possuem cálcio em sua constituição (FONTANETTI; CAMARGO-MATHIAS, 2004), elemento detectado na análise histoquímica.

Qual seria a real função destas estruturas nas glândulas de defesa de *U. atrobrunneus*? Duas hipóteses podem ser sugeridas: 1) o conteúdo dos esferocristais seria lançado para compor a secreção defensiva, ou 2) a liberação destes elementos seria uma forma de excreção, uma vez que estas substâncias estão em constante contato com o animal que vive no solo. As análises realizadas neste trabalho não permite afirmar qual dessas hipóteses seria a mais provável.

Acredita-se que os compostos que formam o líquido final da secreção defensiva estejam armazenados em formas cristalinas, uma vez que são compostos com propriedades extremamente nocivas. A preparação do fluído ocorre no momento em que

há o estímulo para ser descarregada a secreção, os compostos armazenados na forma de cristais e nas vesículas são disponibilizados e misturados no interior da vesícula glandular sendo conduzidos até o poro que se abre externamente através do ducto.

## 5. Agradecimentos

As autoras agradecem à Gerson Mello, Mônica Iamonte e Pablo Henrique Nunes pelo apoio técnico, Raphael Baston de Souza, Annelise Francisco e Cintya Aparecida Christofolletti pelo auxílio nas coletas e à FAPESP (processo: 2011/15278-9) e CNPq pelo apoio financeiro.

## 6. Referências

BARTH, R. Microanatomia e citologia das glândulas peçonhentas de *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Guanabara, **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 65, n. 2, p. 175-195, 1967.

BOCCARDO, L.; PENTEADO, C.H.S.; JUCÁ-CHAGAS, R. Swarming of millipedes, a new case noticed in the district of Patrocínio – MG - Brazil. **Journal Advanced Zoology**, v.18, p.62-63, 1997.

BOCCARDO, L. Surto de diplópodos em área urbana impactada localizada no município de Paulínia-SP. In: XXII Congresso Brasileiro de Zoologia, 1998, Recife, PE. **XXII Congresso Brasileiro de Zoologia**—Abstract 142 , 36, 1998.

BOCCARDO, L; FERNANDES, M. N. Toxicidade do Carbamato Methiocarb para os diplópodos *Gymnostreptus olivaceus* e *Plusioporus setiger*. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 13, n. 2, p. 29-33, 2000.

BOCCARDO, L.; PENTEADO, C.H.S. JUCÁ-CHAGAS, R Migration and population outbreaks of millipedes in the coffee plantations, region of Alto Paranaíba, MG, Brazil. **Holos Environment**, v.2, p.220-223, 2002.

BILLEN, J.; GOBIN, B.; ITO, F. Fine structure of the postpygidial gland in *Aenictus* army ants. *Acta Zoologica (Stockholm)*, v. 80, p. 307-310, 1999.

BLOWER, J.G. Millipedes: Keys and notes for the identification of the species. Linnean Society of London/Estaurine and Brakisch-water Sciences association, London, 1985, 242 p.

BUENO-VILLEGAS, J.; SIERWALD, P.; BOND, J. E. Diplopoda. IN: Bousquets, J. L., J. J. Morrone, O.Y. Ordóñez & I.V. Fernández (eds), **Biodiversidad, taxonomia y biogeografía de artrópodos de México, IV**, 569-599, 2004.

CLOUDSLEY-THOMPSON, J. L. Economics of the 'spotted snake millipede' *Blaniulus guttulatus* Bosc. **Annals and Magazine of Natural History**, Série. 12, n. 2, p. 947-962, 1950.

CHAPMAN, R. F. The insects: structure and function. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1998, 770p.

COSTA-LEONARDO, AA. M.; GONÇALVES, F. A.; LARANJO, L. T. Mandibular glands in reproductive of asian termite *Coptotermes gestroi* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Acta Microscopica*, v. 18, n. 3, p. 220-231, 2009.

CRANE DF, COWDEN RR (1968) A cytochemical study of oocyte growth in four species of millipedes. *Z. Zellforsch.* 90, 414-431.

CRUZ-LANDIM, C. Abelhas: Morfologia e função de sistemas. Editora: Unesp, 407p, 2009.

CRUZ-LANDIM, C.; ABDALLA, F. C. Glândulas exócrinas das abelhas. Editora: FUNPEC, 181p. 2002.

DANGERFIELD, J.M. Abundance, biomass and diversity of soil macrofauna in savanna woodland and associated managed habitats. **Pedobiologia** v. 34, p.141-150, 1990.

EISNER, T. ALSOP, D.; HICKS, K.; MEINWALD, J. Defensive discretion of millipedes. In: **Arthropod venoms** (Handbook of Pharmacology n. 48) ed. S. Bettini, Springer-Verlag, Berlin, p. 41-72, 1978.

EISNER, T.; EISNER, M.; DEYRUP, M. Millipede defense: Use of detachable bristles to entangle ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 93, p. 10848-10851, 1996.

FONTANETTI, C.S. ; CALLIGARIS, I. B. ; SOUZA, T. S. . A millipede infestation of an urban area of the city of Campinas, Brazil and preliminary toxicity studies of insecticide Bendiocarb® to the *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi & Fontanetti, 2006. **Arquivos do Instituto Biológico** (Online), v. 77, p. 165-166, 2010.

FONTANETTI, C. S.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Presence of calcium in oocytes of the diplopod *Rhinocricus padbergi* Verhoeff (Spirobolida, Rhinocricidae). **Acta Histochem. Cytochem.** v. 37, p. 301-306, 2004.

FONTANETTI, C. S.; CALLIGARIS, I. B.; SOUZA, T. S. Laudo sobre o surto de piolho-de-cobra no Parquedas Universidades. Infestação de piolhos-de-cobra em Campinas. <http://www.barao/barao/pq-universidades/laudo.htm>. 2007.

FONTANETTI, C. S.; TIRITAN, B.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Mineralized bodies in the fat body of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda). **Braz. J. Morphol. Sci.**, v.23, n. 3-4, p. 487-493, 2006.

HUBERT , M. Localization and identification of mineral elements and nitrogenous waste in Diplopoda. In: **Myriapod Biology** (Camatini M, ed). Academic Press: London. p. 127-134, 1979.

HUBERT, M. Sur la nature des accumulations minerales et puriques chez *Cylindroiulus teutonicus* Pocock (londinenses CLK, Diplopod, Iuloidea). C. R. Acad. Sci. Paris 281D, p. 151-154, 1975.

HOPKIN, S.P.; READ, H.J. **The biology of millipedes**. New York: Oxford University Press, 2nd ed., 233pp, 1992.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Livraria Editora Santos. 1983. 123p.

KANIA, G.; TRACZ, H. Mass occurrence and migration of *Ommatoiulus sabulosus* (Linnaeus, 1758) (Diplopoda, Julida: Julidae) in Poland. **Peckiana**, v.4, p.57-66, 2005.

LAWRENCE, R.F. **The centipedes and millipedes of Southern Africa: A guide**. Balkema, Cape Town, 1984, 233p.

LISON, L. *Histochimie et cytochimie animales*. Paris: Gauthier Villans, 1960. 842p.

LOCKE, M. The structure and development of the vacuolar system in the fat body of insects. In: **Insect Ultrastructure**. Vol. 2. (King RC, Akai H, ed). Plenum Press: NewYork. p. 151-197, 1984.

MEINWALD, Y. C. MEINWALD, J.; EISNER, T.; 1,2 Dialkyl-4 (3H)-Quinolinones in the defensive secretion of a millipede (*Glomeris marginata*) . *Science*, v. 154, p. 390-391, 1966.

NIJIMA, K.; SHINOHARA, K. Outbreaks of the *Parafontaria laminata* group (Diplopoda, Xystodesmidae). **Japan Journal Ecology**, v.38, p.257-268, 1988.

NOIROT, C.; QUENNEDEY, A. Glands, gland cell, glandular units:some comments on terminology and classification. *Ann. Soc. Entomol.*, v. 27, p. 123-128, 1991.

NOIROT, C.; QUENNEDEY, A. A fine structure of insect epidermal glands. *Ann. Ver. Entomol.*, v. 19, p. 61-80, 1974.

PEARSE, A. T. E. **Histochemistry: theoretical and applied**. London: J&A. Churchill, 1960, 998p.

PETIT, J. Sur la et l'acumalation de substances minerales dans lês ovocytes de *Polydesmus complanatus* (Myr. Dipl.). *C. R. Acad. Sci. Paris* 270D, p. 2107-2110, 1970.

QUENNEDEY, A. Insect epidermal gland cells: ultrastructure and morphogenesis. In: HARRISON, F. W.; LOCKE, M. (eds). *Microscopy anatomy of invertebrates*. London: Wiley-Liss, p.177-207, 1998.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados: Uma Abordagem Funcional-evolutiva**. 7 ed. São Paulo. Roca, 2005. 1145p.

SHELLEY, R. M. Centipedes and millipedes, with emphasis on North America fauna. *Kansas School Nat.* v. 45, n. 3, p. 1-15, 1999.

VIEIRA, A. S.; BUENO, O. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Ultrastrutural profile of metapleural gland cells of the ant *Atta laevigata* (F. Smith, 1858) (Formicidae: Attini). *Animal Biology*, v. 62, p. 1-11, 2012.

WU, X.; BUDEN, D. W.; ATTYGALLE, A. B. Hydroquinones from defensive secretion of a giant Pacific millipede, *Acladocricus setigerus* (Diplopoda: Spirobolida). **Chemoecology**, v. 17, p. 131–138, 2007.

## Legendas

**Figura 1:** Micrografias eletrônicas das glândulas de defesa de *U. atrobrunneus*.

A. glândulas de defesa dispostas nos segmentos do corpo do milípede; B. detalhe da glândula de defesa envolta pelos feixes de fibras musculares; C. Vista geral da glândula inteira (reservatório + ducto); D. Detalhe da superfície da glândula.

d: ducto; fm: fibras musculares; gd: glândula de defesa; s: segmento; vg: vesícula glandular.

**Figura 2:** Secções histológicas da glândula de defesa de *U. atrobrunneus* coradas com hematoxilina/eosina. A. Vista geral da glândula; B. Vesícula glandular; C. Detalhe da anterior; D e E. Camadas da cutícula; F. Detalhe do ducto da glândula.

c: cutícula; cg: células glandulares; cgp: corpo gorduroso parietal; d: ducto; l: lúmen; n: núcleo; v: vacúolo; vg: vesícula glandular; seta em B e C: canalículos presentes por entre as células glandulares; seta em D: canais-poro.

**Figura 3:** Secções histológicas da glândula de defesa de *U. atrobrunneus*. A. Vesícula glandular; B. Detalhe da anterior; C: Ducto; D e E. Esferocristais. A, B, C. Submetidas às técnicas de azul de bromofenol; C, D. Submetida à técnica de von Kossa.

c: cutícula; c-: célula clara; c+: célula escura; d: ducto; e: epitélio; es: esferocristal; l: lúmen.

**Figura 4:** Micrografias eletrônicas da glândula de defesa de *U. atrobrunneus*. A e B. Vista geral da vesícula glandular; C. Células preenchidas por grânulos protéicos e por células preenchidas por esferocristais; D. Retículo endoplasmático rugoso; E e F. Canalículo/End apparatus.

c: cutícula; c1: célula classe 1; c3: célula classe 3; ea: end apparatus; es: esferocristal; ca: canalículo; j: junção celular; l: lúmen; lb: lâmina basal; g: grânulo de proteína; mi: mitocôndria, mv: microvilosidade; n: núcleo; rer: retículo endoplasmático rugoso.

**Figura 5:** Micrografias eletrônicas da glândula de defesa de *U. atrobrunneus*. A, B e C. Cutícula da vesícula glandular; D. Detalhe da anterior; E. Ducto; E. Cutícula do ducto.

c: cutícula; c1: célula classe 1; ca: canal; fm: figura mielínica; es: esferocristal; j: junção celular; lúmen; lb: lâmina basal; n: núcleo; cp: canal-poro; s: secreção; sc: espaço subcuticular.

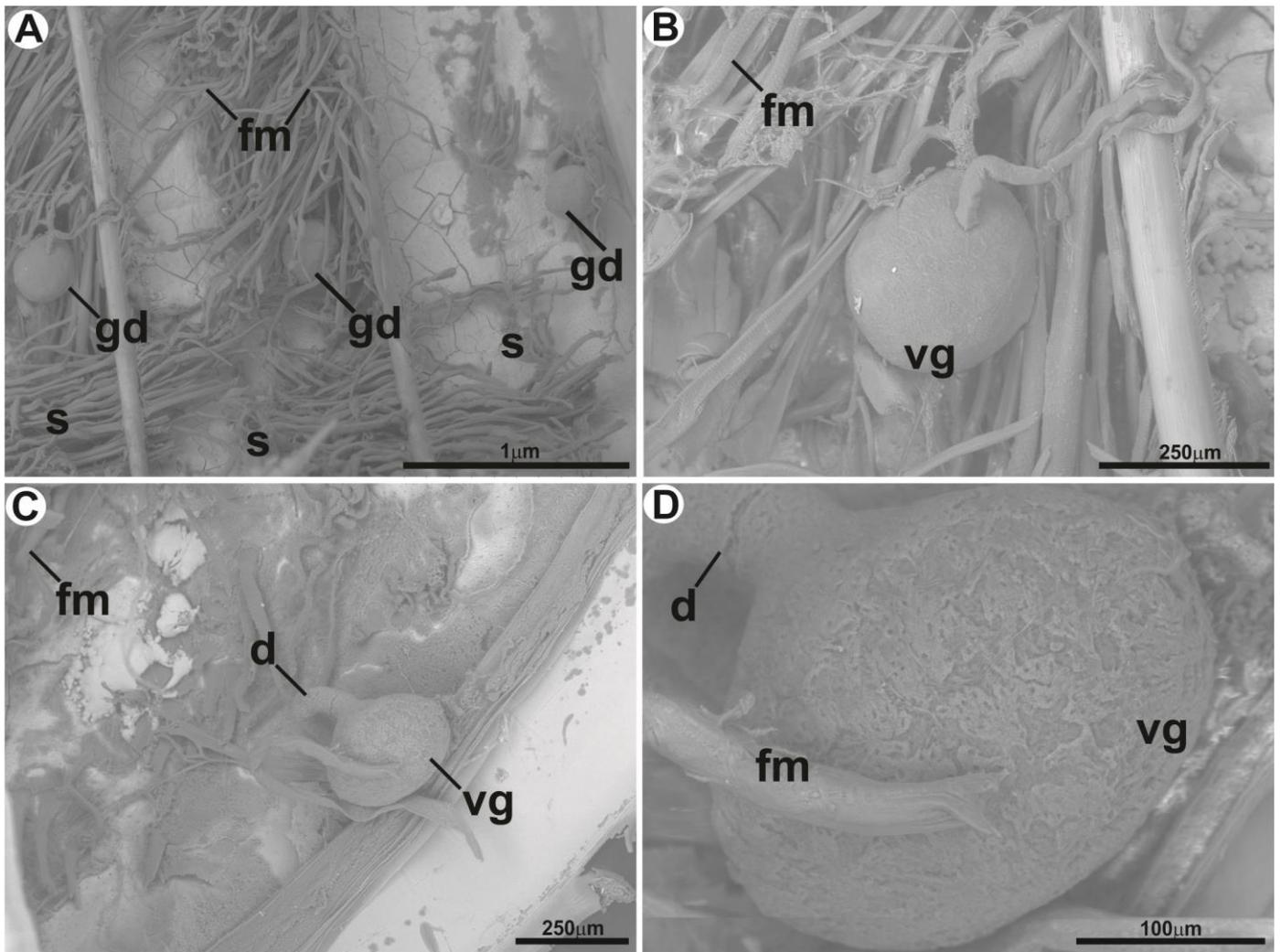


Figura 1

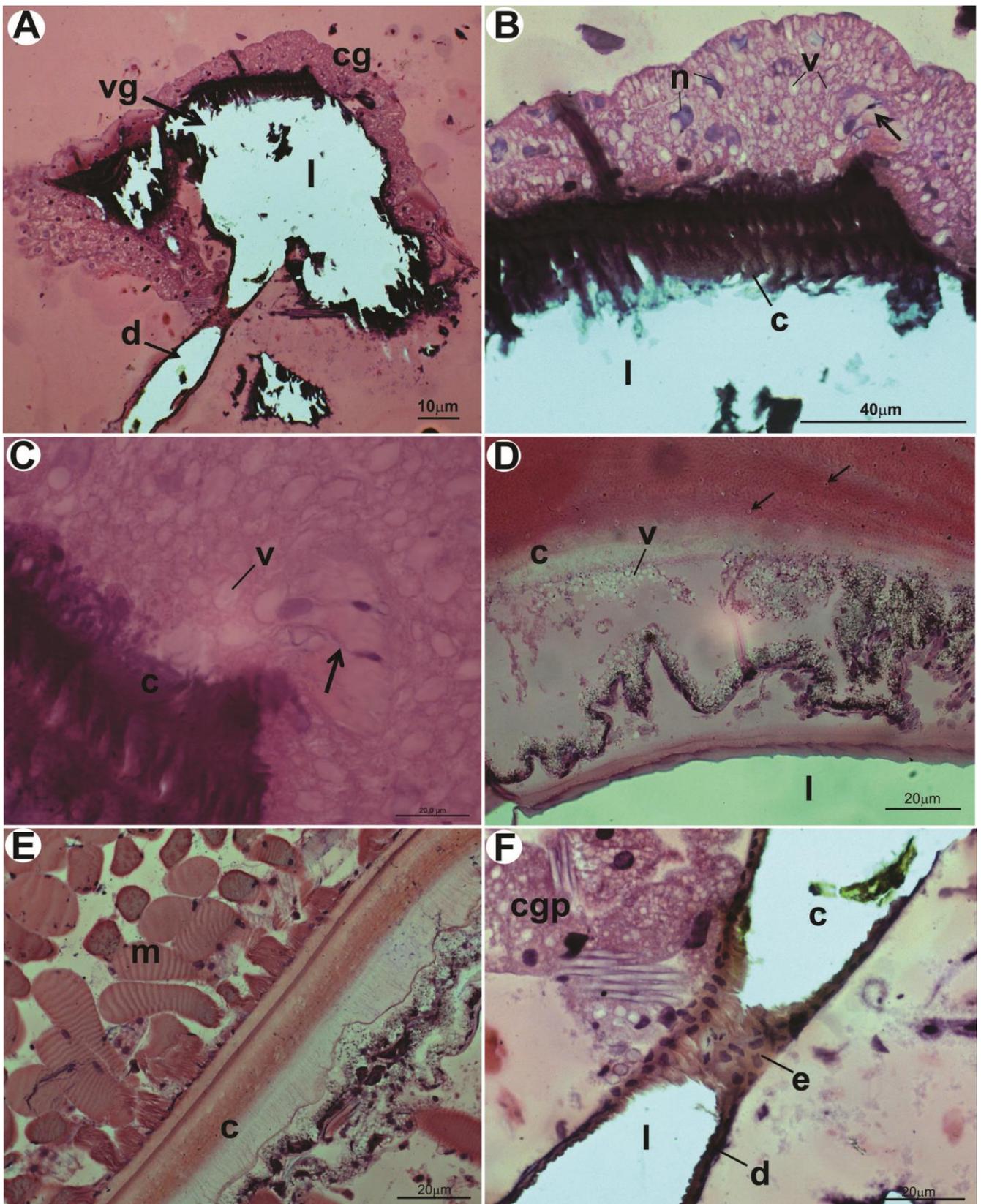
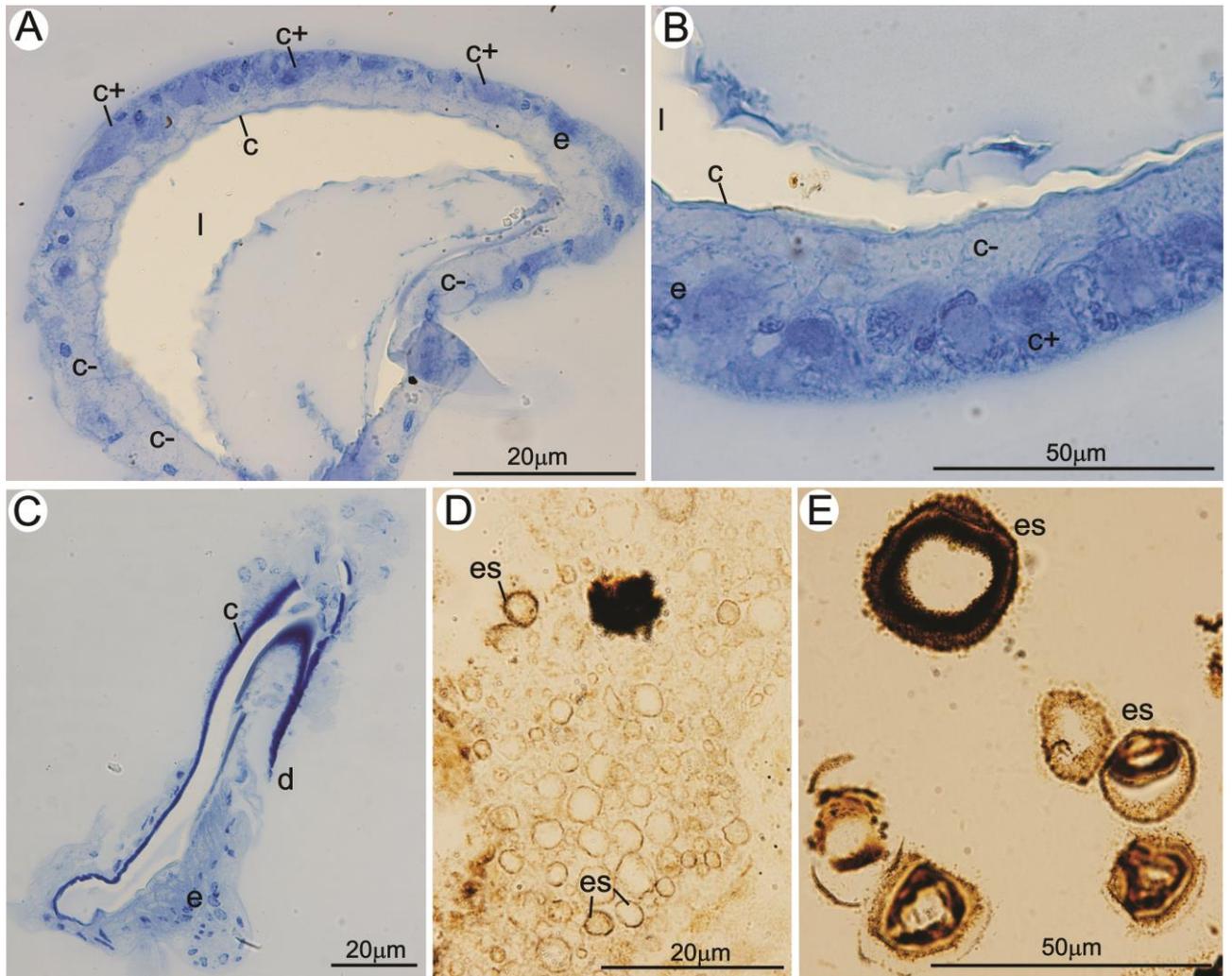
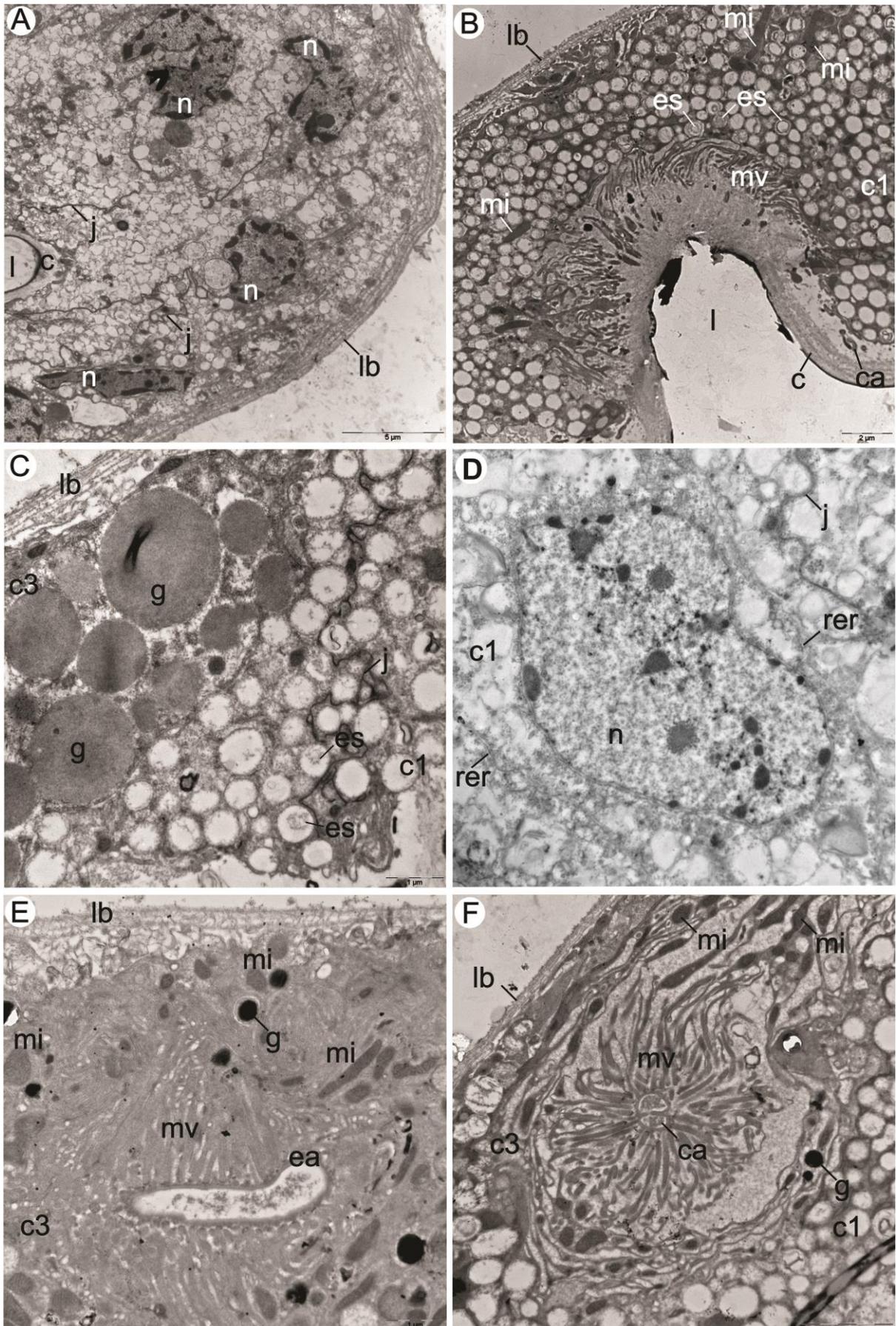


Figura 2



**Figura 3**



**Figura 4**

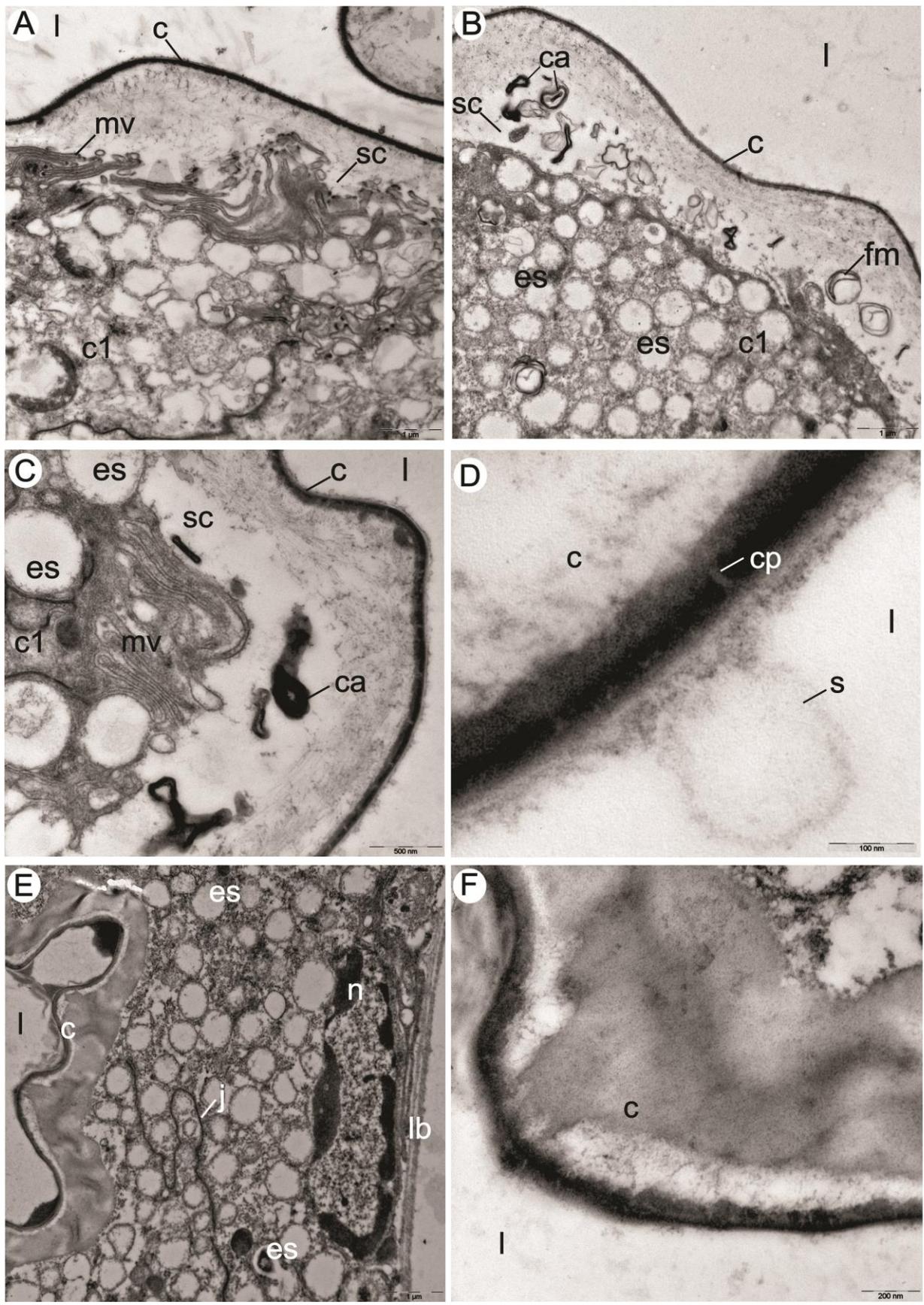


Figura 5

**ARTIGO 3****Defensive secretion of the synanthropic millipede *Urostreptus atrobrunneus*  
(Spirostreptidae)****Cristina Moreira de Sousa<sup>1</sup>, Sebastião Zanão Filho<sup>2</sup>, Marcela Paula Silva<sup>1,2</sup>,  
Lucilene Delazari dos Santos<sup>3</sup>, Carmem Silvia Fontanetti<sup>1,4</sup>**

1. Department of Biology – Institute of Biosciences, Rio Claro, São Paulo, Brazil.  
Av. 24-A, 1515, CEP: 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brazil.

2. Center for the Study of Social Insects (CEIS), São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Rio Claro, São Paulo, Brazil.

3. Center for the Study of Venoms and Venomous Animals (CEVAP), São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil, [lucilene@cevap.org.br](mailto:lucilene@cevap.org.br)

4. Corresponding author: Dr. Carmem S. Fontanetti, Department of Biology – Institute of Biosciences, Rio Claro, São Paulo, Brazil. Av. 24-A, 1515, CEP: 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brazil, [fontanet@rc.unesp.br](mailto:fontanet@rc.unesp.br)

**Abstract**

Diplopods are important soil macroarthropods and essential for ecosystem maintenance and balance. These animals live under logs, rocks, leaves, dark places, feed on decomposing organic matter, and enrich, aerate, and humify the soil. They do not occur in high densities, but some environmental disturbances, such as climate changes and pesticide use, can trigger population explosions. They have few natural enemies due to their integument impregnated with calcium and defensive or repugnatorial glands that secrete toxic substances with strong and unpleasant odor when the animal is disturbed. The millipede *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi & Fontanetti, 2006 has been found infesting areas in urban centers in the of São Paulo state, Brazil, and has become a nuisance to human populations. Because of its close contact with humans, information on the defensive mechanisms of this species is needed. As a contribution to

understanding this potential “pest”, this study reports on the compounds present in the secretion of the defensive glands of the millipede *U. atrobrunneus*, analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The defensive secretion of *U. atrobrunneus* consists of mainly benzoquinones, benzaldehydes and their isomers, commonly found in others members of the order Spirostreptida.

**Keywords:** chemical defense, defensive glands, GC-MS, benzoquinones.

## Introduction

The millipede *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi & Fontanetti, 2006 (Spirostreptidae) is a synanthropic species that has received much attention from researchers due to its high proliferation rate in some urban centers in the São Paulo state, Brazil (BOCCARDO, 1998; FONTANETTI et al., 2007).

Diplopods usually do not have occur in high densities, but some studies have reported that environmental disturbances, such as climate changes and the use of pesticides that eliminate competitors, can trigger population explosions (CLOUDSLEY-THOMPSON, 1950; NIJIMA; SHINOHARA, 1988; BOCCARDO et al., 1997, 2002; KANIA; TRACZ, 2005; FONTANETTI et al., 2010).

Diplopods are animals with few natural enemies, due to its resistant exoskeleton that make them unpalatable, and the presence of defensive or repugnatorial glands that secrete substances with strong and unpleasant odor when the animal is disturbed (RUPPERT et al., 2005).

Most millipedes are slow moving animals that cannot flee to avoid attacks. Therefore they use physical or chemical defensive methods, such as coiling up or excreting fluids from defensive glands (MEINWALD et al., 1966).

Defensive glands are present in most millipedes, except in members of the subclass Penicillata, and of the orders Sphaerotheriida and Chordeumatida. There is usually only one pair of defensive glands per segment, suggesting that they evolved after the development of diplosegments (HOPKIN; READ, 1992).

The primary role of the defensive secretion produced by these millipedes is to provide protection against predators, as it has anesthetic properties. The secondary role of the defensive secretion may be antimicrobial and antifungal (MARAKOV et al., 2010).

The description of defensive glands of millipedes is an important tool for the classification of taxonomic groups, as well as species identification. Individuals from the same family exhibit similar gland apparatus, although the composition of the secretion present in the gland can differ considerably (WU et al., 2007).

Therefore, millipedes can be characterized according to the substance they discharge from their defense glands. Benzoquinones are commonly found in the secretion of members of the orders Julida, Spirobolida, and Spirostreptida. Millipedes that excrete phenols belong to the order Callipodida, while those that release cyanogenic compounds to the order Polydesmida, quinazolinones to the order Glomerida, and alkaloids to the order Polyzoniida (EISNER et al., 1996).

Several compounds have been identified in the different orders of millipedes, including benzoquinones and hydroquinones, phenols, benzoic acid, benzaldehyde, and alkaloids (EISNER et al., 1998; DEML; HUTH, 2000; KUWAHARA et al., 2002; ARAB et al., 2003; WU et al., 2007; MARAKOV et al., 2010). Since the secretion composition varies depending on the species, the presence of iodine, chlorine, and cyanide have also been reported. The latter is produced when necessary, by mixing an atoxic precursor and an enzyme that when released, has an odor resembling bitter almonds, a toxic compound for invertebrates and repellent to small vertebrates (ARAB et al., 2003; KUWAHARA et al., 2002; RUPPERT et al., 2005).

Many studies have examined the compounds in the secretion of the defensive glands of millipedes, indicating that they can cause strong irritation of the skin and mucous membranes of eyes and nose in humans (WU et al., 2007). Injuries, such as burns, involving these animals have been reported (GIRARDIN; STEVESON, 2002). Despite the lack of evidence of human deaths by millipedes (known for killing lizards), their secretion can cause considerable discomfort when in contact with a sensitive skin, causing pigmentation, inflammation, and blindness when in contact with the eyes (LIMA et al., 2010; HADDAD JUNIOR et al., 2000).

The species *U. atrobrunneus* is a potential pest in urban centers of the state of São Paulo and information on the compounds present in the defensive glands of this species is of special interest, since the contact with the human population or even with other animals can cause injuries. Thus aim of this work is to characterize the contents of the defensive secretion of the millipede by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS).

## Material and methods

### 1.1 Secretion extraction from the defensive gland

Adult specimens of *U. atrobrunneus* were collected in the suburbs of the city of Rio Claro, São Paulo, Brazil. The animals were acclimated and maintained alive in a terrarium for secretion extraction.

For the extraction of the contents of the defensive gland, each diplopod was placed individually in a petri dish. The stress necessary for the animal to release the content of its defense glands was caused by manipulating the animal with the aid of forceps. The secretions were collected with filter paper and placed in vials with the solvent dichloromethane. Vials were stored for elution with solvent and later analysis.

### 1.2 Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS)

Prior to the analysis of the material, a blank sample was run, consisted of dichloromethane and a clean filter paper, the same used for absorbing gland secretions, to eliminate the possibility of contamination.

Samples were analyzed by gas chromatography – mass spectrometry. Gas chromatography was carried out with a GC2010 Shimadzu with AOC-20i automatic injector and a 30 m x 0.5 mm RTX-5MS Restec column. Mass spectrometry was performed with a GCMS-QP2010 Shimadzu Plus. The results were analyzed with the software Labsolution GCMS solution 2.53 sui, database NIST MS search 2.0 (NIST 8).

Chromatographic conditions: 1  $\mu$ L of the sample was injected into the chromatograph, the initial temperature of the column was 80°C, the injector temperature was 290°C, the injection mode was splitless with sample time of 1 minute, the flow control mode was linear velocity (50 cm/sec). The temperature program was as follows: 80°C held for 3 minutes, 10°C/min to 270°C held for 5 minutes, total time: 27 minutes.

Mass spectrometric conditions: the ionization chamber temperature was 230°C, interface temperature was 270°C, the solvent cut time was 3 minutes. The mass range in full scan acquisition mode was 40 - 550 m/z. The mass spectra were obtained by electron impact ionization at 70 eV.

## Results

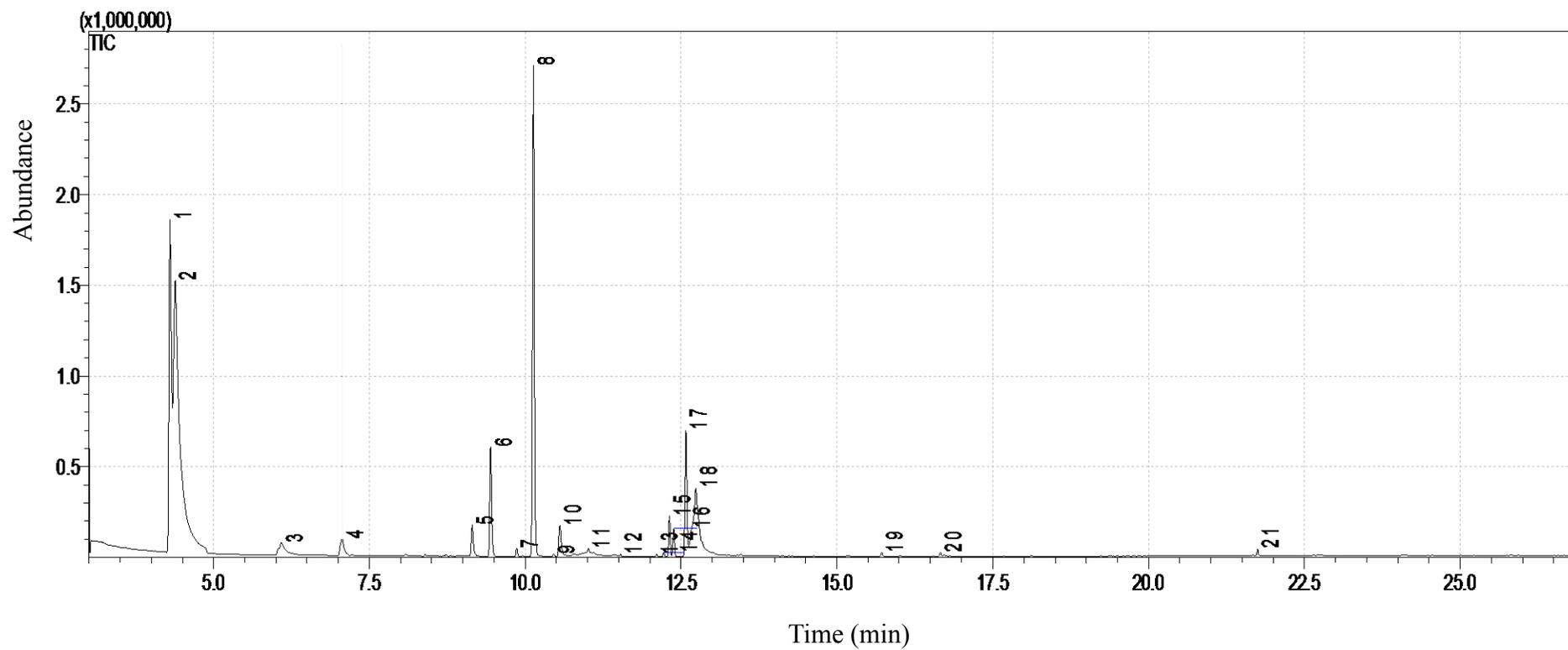
Eighteen compounds were identified in the defensive secretions of the species *U. atrobrunneus* by GC-MS.

The extraction with dichloromethane allowed the identification of benzoquinones and its variations, hydroquinones and precursors, phenols and acetic compounds. The compounds were identified using the NIST database.

The peaks identified in the chromatogram (Fig. 1) represented the following compounds: (1) p-benzoquinone, 2-methyl, (2) p-benzoquinone, 2-methyl, (3) 2,5,5-trimethyl -2-cyclohexenone, (4) Unidentified compound, (5) (Phenylthio) acetic acid, undec-2-enyl ester, (6) 1,4-benzenediol, 2-methyl, (7) 2,4,6,(1H,3H,5H)-pyrimidinetrione, 5-acetyl, (8) benzaldehyde, 3-(chloroacetoxy)-4-methoxy, (9) cyclobutane, 1,1,2,3,3-pentamethyl, (10) dimethyl phthalate, (11) and (12) unidentified compounds, (13) N-[4-(ethyl-methyl-amine)-phenyl]-acetamide, (14) 4-propylbenzaldehyde diethyl acetal, (15) phenol, 2-(1-methyl-2-butenyl)-4-methoxy, (16) 3-buten-2-one, 4-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl), (17) and (18) diethyl phthalate.

Based on the identification, the compounds (10), (11), (12), (17), and (18) are substances present in the solvent used during extraction.

Table 1 presents the relative percentage of the most important compounds (and their isomers) found in the defensive secretion of the millipede *U. atrobrunneus*.



**Figure 1.** GC-MS total chromatogram of the dichloromethane extract of the defensive secretion of *U. atrobrunneus*.

**Tabela 1:** Relative percentage of the most important compounds (and isomers) identified by GC-MS.

Peak	Retention time	Relative percentage	Compound
1 e 2	4,307 min	57,88%	p-Benzoquinone/ 2,5-cyclohexadiene-1,4-dione- 2-methyl
3	6,092 min	0,04%	Trimethylcyclohex-2-enone/ 2,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1-one
5	9,157min	1,32%	Phenylthio acetic acid/ undec-2-enyl ester
6	9,450min	4,66%	1,4-Benzenediol/(hidroquinone)
7	9,867	0,31%	2,4,6,(1H,3H,5H)-Pyrimidinetrione 5-acetyl/5-acetil, 2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona 5-acetil
8	10,134min	20,26%	Benzaldehyde/3-(chloroacetoxy)-4-methoxy
9	10,459min	<0,08	Cyclobutane, 1,1,2,3,3-pentamethyl
13	12,108min	0,14%	N-[4-(Ethyl-methyl-amino)-phenyl]-acetamide

## Discussion

The compounds identified in the defensive secretion of *U. atrobrunneus* are commonly found in members of the order Spirostreptida, to which this species belongs. The main compound is benzoquinone and its precursors. Studies have reported that the presence of benzoquinone in the defensive secretion of millipedes confers anesthetic, antimicrobial, and antifungal properties, in addition to being highly irritant and insect repellent (MARA KOV et al., 2010).

Quinones and their precursors are components of the secretion of other millipedes known to produce them such as species of the orders Spirobolida, Spirostreptida, and Julida (HOPKIN; READ, 1992).

Several studies have analyzed the defensive secretions of diploids by GC-MS, reporting new compounds, as well as the identification of previously described ones, and their occurrence in other diplopods.

Attygalle et al. (1993) identified the presence of six quinones in the defensive secretion of the millipede *Floridobolus penneri* (Spirobolida). Two were identified as the main compounds, 2-methyl-1,4-benzoquinone and 2-methoxy-3-methyl-1,4-benzoquinone, representing 95% of the secretion. The remaining compounds were: 2,5-dimethyl-3-methoxy-1,4-benzoquinone, which was characterized as a new natural product, 2,3-dimethoxy-1,4-benzoquinone, 2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone, and 2-hydroxy-3-methyl-1,4-benzoquinone. The latter was experimentally characterized from a microbial source. No differences in secretion composition were found between males and females. The authors observed that flies that infest *F. penneri* seemed to be attracted by the quinoid secretion of its host (ATTYGALLE et al., 1993). In the present study, the analysis of the secretion of *U. atrobrunneus* revealed that some compounds, such as benzoquinones, are the same as those found in *F. penneri* and might play similar roles.

The presence of benzoquinones in several organisms is well known. Several benzoquinones have been characterized from plants, microorganisms, and animals such as sea urchins, soft corals, and sponges (EISNER et al., 1978; BLUM, 1981). The natural role of these compounds is often obscure, although in some cases they play antimicrobial and/or antifeedant roles (ATTYGALLE et al., 1993).

Among terrestrial animals, 1,4-benzoquinones are usually produced by arthropods, including millipedes and a wide variety of insects and arachnids. There

seems little doubt that in these animals, quinones serve to repel predators (EISNER et al., 1978).

The European species *Glomeris marginata* produces quinazolinones, which belong to the same class of compounds of the synthetic drug Quaalude, a powerful sedative. When exposed to this defensive chemical, wolf spiders become sedated after an encounter with *Glomeris marginata* (CARREL; EISNER, 1984).

There are records in the literature that monkeys and other animals anoint their bodies with the defensive secretion of millipedes to repel mosquitoes and other ectoparasites. This implies some risks, since benzoquinones are toxic and carcinogenic. However, the authors suggest that the immediate benefits to monkeys outweighs long-term risks (VALDERRAMA et al., 2000).

When in contact with human skin, the expelled liquids and vapors cause a burning sensation, resembling a minor burn. The site becomes instantly hyperchromic, with colors ranging between light yellow and dark brown, due to the action of quinones. Prolonged contact with the animal (trapped in clothes, for example) can result in more severe lesions, formation blisters, and exulceration. The inflammatory process is always present, even in minor hyperchronic lesions, and the hyperpigmentation can persists for months. The rare incidents with humans involved children and professionals collecting these animals for research without proper care (LIMA et al., 2010; HADDAD JUNIOR et al., 2000).

When secretions of millipedes get in contact with the eye mucosa, serious injuries may occur, resulting in conjunctivitis and corneal ulceration. Musgrave (1943) reported an injury that evolved into complete loss of sight within seven days.

The defensive secretions of some polydesmid millipedes exhibited antifungal activity, suppressing mycelial growth and germination of fungal spores exposed to ten different millipedes isolated from adjacent soils. A group of compounds was termed system I, which were identified from members of the Xystodesmidae family. It consisted of benzaldehyde, benzoic acid, benzoyl cyanide, methyl benzoate, and mandelonitrile. Benzoic acid and benzoyl cyanide were the best inhibitors of mycelial growth and spore germination at the concentrations of 250, 500 or 1000mg/ml. A mixture of four defensive compounds (total of 125mg/ml) decreased spore germination more efficiently than individual compounds, apparently acting synergistically. The mixtures that resulted in ethyl benzoate, guaiacol, and phenol were termed by the authors as system II for the species *Oxidus gracilis*. In spore germination tests, phenol

caused maximum inhibition at the concentrations of 500 to 1000mg/mL, while other compounds were less efficient. The mixture of defensive compounds did not improve the suppression of germination of spores (RONCADORI et al., 1985).

Similar tests have not been conducted with the defensive secretion of the millipede *U. atrobrunneus*. However, the presence of compounds with phenol in its secretion suggest a role in protecting the animal from microorganisms, as observed by Roncadori et al. (1985).

Arthropods share many characteristics, and the same occurs with the contents of their defensive glands. The defensive compounds produced by these animals are very similar.

Laboratory studies have demonstrated the repellent properties of the defensive secretion of opiliones. Lima et al. (2007) analyzed the antimicrobial activity of the repellent liquid from two species of opiliones. The authors reported that the pair of defensive glands of these animals produce a repellent secretion composed of alcohols, aldehydes, ketones, phenols, and quinones, in isolation or combined. These are highly volatile compounds and irritable to invertebrates and vertebrates, such as ants, spiders, and frogs. These classes of compounds, also found in the defensive secretion of *U. atrobrunneus*, may have similar roles.

The analysis of repellent secretions of the species *Goniosoma albiscriptum* revealed the presence of three benzoquinones: 2, 3-dimethyl-1,4-benzoquinone, 2-ethyl-3-methyl-1,4- benzoquinone and 2, 3, 5-trimethyl-1,4-benzoquinone, and two hydroquinones: 2,3-dimethyl- hydroquinone and 2, 3, 5-trimethyl-hydroquinone. Thus the repellent liquid consisted mostly of derivatives of 1,4- benzoquinone and their corresponding hydroquinones. These quinones had a potent antimicrobial activity for Gram positive and negative bacteria, as well as fungi (LIMA et al., 2007).

Ruther et al. (2001) described growth inhibition in *E. coli* in the presence of 1,4-benzoquinone and 2-methyl-1,4- benzoquinone (toluquinone) isolated from the defensive secretion of the beetle *Melolontha hippocastani*. The authors also pointed out that 1,4- benzoquinone plays a role not only in defense, but is also involved in sexual communication. The evolution of multifunctional semiochemicals is relatively common among arthropods (BLUM, 1996).

The involvement of defensive secretion in sexual behavior has been reported in Heteroptera (SMITH et al., 1991), Coleoptera (PESCHKE; METZLER, 1982), and

Hymenoptera (HÖLLDOBLER, 1971). The same may occur in millipedes, since 1,4 benzoquinone is the main compound of defensive glands of several species.

Our findings on the composition of the secretion discharged by *U. atrobrunneus* provided insights to better understand the effects that these defensive compounds may have, since they are known to be strong repellents to invertebrates and vertebrates, and cause irritation to the human skin and mucosa. The chemistry of the volatile compounds found in this species are very similar to those of other species of diplopods, as well as arthropods, demonstrating that these animals have similar defensive strategies against predators and/or infectious agents.

In *U. atrobrunneus*, the most relevant compounds were benzoquinones and benzaldehydes. According to the literature, these compounds play important roles in warding off predators, due to the high toxicity conferred by n-heterocyclic rings, in addition to protection against microbial contamination. The remaining compounds in smaller quantities might have a synergistic effect, maximizing their corresponding roles.

### **Acknowledgments**

The authors thank Dr. Odair Correa Bueno for allowing the use of equipment for the conduction of tests, Raphael Baston de Souza, Annelise Francisco and Cintya Aparecida Christofoletti for assistance during collections, and FAPESP (process: 2011/15278-9) and CNPq for financial support.

### **References**

ARAB, A.; ZACARIN, G. G.; FONTANETTI, C. S.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; SANTOS, M. G.; CABRERA, A. C. Compositions of the defensive secretion of the Neotropical millipede *Rhinocricus padbergi* Verhoeff 1938 (Diplopoda: Spirobolida: Rhinocricidae). **Entomotropica**, Maracay. v.18, n.2, p.79-82. 2003.

ATTYGALLE, A. B.; XU, S. C.; MEINWALD, J.; EISNER, T. Defensive secretion of the millipede *Floridobolus penneri*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 10, p. 1700-1706, 1993.

BOCCARDO, L.; PENTEADO, C.H.S.; JUCÁ-CHAGAS, R. Swarming of millipedes, a new case noticed in the district of Patrocínio – MG - Brazil. **J. Adv. Zool**, v.18, p.62-63, 1997.

BOCCARDO, L. Surto de diplópodos em área urbana impactada localizada no município de Paulínia-SP. In: XXII Congresso Brasileiro de Zoologia, 1998, Recife, PE. **XXII Congresso Brasileiro de Zoologia**—Abstract 142, 36, 1998.

BOCCARDO, L.; PENTEADO, C. H. S.; JUCÁ-CHAGAS R. Migration and population outbreaks of millipedes in the coffee plantations, region of Alto Paranaíba, MG, Brazil. **Holos Environment**, n. 2, p. 220-223, 2002.

BLUM, M. S. “**Chemical Defenses of Arthropods**“ Academic Press, New York, 1981.

BLUM, M. S. Semiochemical parsimony in the Arthropoda. **Ann. Rev. Entomol.**, v. 41, p. 353–374, 1996.

CARREL, J. E.; EISNER, T. Spider sedation induced by defensive chemicals of milliped prey. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 81, p. 806-810, 1984.

CLOUDSLEY-THOMPSON, J. L. Economics of the ‘spotted snake millipede’ *Blaniulus guttulatus*. **Annals and Magazine of Natural History**, n.12, p. 947-962, 1950.

DEML, R.; HUTH, A. Benzoquinones and hydroquinones in defensive secretions of tropical millipedes. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 87, p.80-82, 2000.

EISNER, T.; ALSOP, D.; HICKS, K.; MEINWALD, J. In: “**Arthropod Venoms.**” Ed. by S. Bettini, Springer Verlag, Berlin, 1978.

EISNER, T.; EISNER, M.; DEYRUP, M. Millipede defense: Use of detachable bristles to entangle ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 93, p. 10848-10851, 1996.

EISNER, T.; EISNER, M.; ATTYGALLE, A. B.; MEINWALD, J. Rendering the inedible edible: Circumvention of a millipede’s chemical defense by a predaceous beetle larva (Phengodidae). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.95, p.1108-1113, 1998.

FONTANETTI, C. S.; CALLIGARIS, I. B.; SOUZA, T. S. Laudo sobre o surto de piolho-de-cobra no Parque das Universidades. Infestação de piolhos-de-cobra em Campinas. <http://www.barao/barao/pq-universidades/laudo.htm>. 2007.

FONTANETTI C. S.; CALLIGARIS, I. B.; SOUZA, T. S. A millipede infestation of an urban area of the city of Campinas, Brazil and preliminary toxicity studies of insecticide Bendiocarb to the *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi & Fontanetti, 2006. **Arquivos do Instituto Biológico**, SP n. 77, p. 165-166, 2010.

GIRARDIN, B. W.; STEVESON, S. Millipedes – Health consequences. **Journal Emergency Nursing**, Saint Louis, v.28, 0.2, p.107-110, 2002.

HADDAD JÚNIOR, V.; CARDOSO, J. L. C.; ROTTA, O.; ETEROVIC, A. Accidents provoked by Millipede with dermatological manifestations: report of two cases. **Anais Brasileiros Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 75, n. 4, p. 471-474, 2000.

HÖLLDOBLER, B. Sex pheromone in the ant *Xenomyrmex floridanus*. **J. Insect Physiol.** v.17, p. 1497–1499, 1971.

HOPKIN, S. P.; READ, H. J. **The biology of millipedes**. New York, Oxford University Press, 2ed, 233p, 1992.

KANIA G, TRACZ H. Mass occurrence and migration of *Ommatoiulus sabulosus* (Linnaeus, 1758) (Diplopoda, Julida: Julidae) in Poland. **Peckiana** n. 4, p. 57-66, 2005.

KUWAHARA, Y.; ÔMURA, H.; TANABE, T. 2-Nitroethenylbenzenes as natural products in millipede defense secretion. **Naturwissenschaften**, Berlin, v.98, p.308-310, 2002.

LIMA; C. A. J.; CARDOSO, J. L. C.; MAGELA, A.; OLIVEIRA, F. G. M.; TALHARI, S.; HADDAD JUNIOR, V. Exogenous pigmentation in toes feigning ischemia of the extremities: a diagnostic challenge brought by arthropods of the

Diplopoda Class (“millipedes”). *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 85, n. 3, p. 391-392, 2010.

LIMA, M. E. L.; ZAMPAULO, R. A.; MORENO, P. R. Análise da atividade antifúngica do líquido repelente em duas espécies de opiliões cavernícolas: *Goniossoma albiscriptum* e *Goniossoma* sp (Opiliones: Gonyleptidae). In: *Anais do XXIX Congresso de Espeleologia*, 2007.

MAKAROV, S. E.; ČURČIĆ, B. P. M.; TEŠEVIĆ, V. V.; JADRANIN, M. B.; VUJISIĆ, L. V.; ČURČIĆ, S. B.; MANDIĆ, B. M.; SEKULIĆ, T. L.; MITIĆ, B. M. Defensive Secretions in Three Species of Polydesmids (Diplopoda, Polydesmida, Polydesmidae). *Journal Chemical Ecology*, v.36, p. 978–982, 2010.

MEINWALD, Y. C.; MEINWALD, J.; EISNER, T.; 1,2 Dialkyl-4 (3H)-Quinozolinones in the defensive secretion of a millipede (*Glomeris marginata*) . *Science*, v. 154, p. 390-391, 1966.

MUSGRAVE, A. Some arachnids and millipedes from New Guinea. *Aust. Museum Mag.*, v. 8, p.132-135, 1943.

NIIJIMA, K.; SHINOHARA, K. Outbreaks of the *Parafontaria laminata* group Diplopoda, Xystodesmidae). *Japan Jour. Ecol.*, v.38, p.257-268, 1988.

PESCHKE, K.; METZLER, M. Defensive and pheromonal secretion of the tergal gland of *Aleochara curtula*. II. The chemical composition. *J. Chem. Ecol.*, v. 8, p. 773–783, 1982.

PIEROZZI, P. H. B.; FONTANETTI, C.S. A new species of *Urostreptus* (Diplopoda, Spirostreptidae): description and chromosome number. *Iheringia*. Série Zoologia (Impresso), v. 96, p. 209-212, 2006.

RONCADORI, R. W.; DUFFEY, S. S.; BLUM, M. S. Antifungal activity of defensive secretions of certain millipedes. *Mycologia*, v. 77, n. 2, p. 185-191, 1985.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados: Uma Abordagem Funcional-evolutiva**. 7 ed. São Paulo. Roca, 2005. 1145p.

RUTHER, J.; PODSIADLOWSKI, L.; HILKER, M. Quinones in cockchafers: additional function of a sex attractant as an antimicrobial agent. **Chemoecology**, v. 11, p. 225-229, 2001.

SMITH, R. F.; PIERCE, H. D.; BORDEN, J. H. Sex pheromone of the mullein bug, *Campylomma verbasci* (Meyer) (Heteroptera: Miridae). **J. Chem. Ecol.**, v. 17, p. 1437–1447, 1991.

VALDERRAMA, X.; ROBINSON, J. G.; ATTYGALLE, A. B.; EISNER, T. Seasonal anointment with millipedes in a wild primate: a chemical defense against insects? **J. Chemic. Ecol.**, New York, v.26, n.12, p.2781-2789, 2000.

WU, X.; BUDEN, D. W.; ATTYGALLE, A. B. Hydroquinones from defensive secretion of a giant Pacific millipede, *Acladocricus setigerus* (Diplopoda: Spirobolida). **Chemoecology**, v. 17, p. 131–138, 2007.

## 6. CONCLUSÕES FINAIS

Diante das análises realizadas com as glândulas de defesa do milípede *U. atrobrunneus*, pode-se concluir que:

- Os milípedes possuem diversos mecanismos de defesas, os quais podem ser classificados como físicos e químicos. Os físicos estão relacionados ao comportamento do animal diante de um ataque ou ameaça de predador: a) considerando sua forma lenta de locomoção, os milípedes podem enrolar-se, ficando imóveis por um tempo, com o intuito de enganar o predador; b) algumas espécies podem contrair o corpo violentamente, realizando movimentos de serpente; c) as espécies desprovidas de glândulas de defesa lançam cerdas rígidas em direção ao predador; d) o ato de defecar quando irritados; e) o exoesqueleto calcificado confere uma barreira física contra os predadores, na medida em que torna estes animais impalatáveis.

- Os mecanismos de defesa classificados como químicos residem: a) na presença da glândula de defesa; b) na coloração aposemática, pois embora seja visual, este é um mecanismo fisiológico que sinaliza que os fluídos defensivos do animal são muito perigosos para o predador; c) na bioluminescência, um recurso utilizado por um gênero específico, que confere uma proteção adicional ao fluído defensivo.

- As análises morfológicas da glândula permitiram identificá-la como uma glândula tipo 2, que segundo a classificação proposta por Eisner et al. (1978) especificamente para glândulas de diplópodos, pois é uma estrutura relativamente simples, um saco esférico dotado de um ducto condutor que se abre no poro localizado na lateral do corpo do animal. Este tipo glandular é comumente encontrado nos representantes da ordem Spirostreptida. A porção glandular é composta por um epitélio formado por células glandulares pertencentes à classe 1 e classe 3, segundo a classificação proposta por Noirot e Quennedy (1974, 1991) para células glandulares em insetos. Essas células apresentam conteúdo protéico e grande quantidade de esferocristais em seu citoplasma.

- Os compostos presentes na secreção defensiva do milípede *U. atrobrunneus* foram condizentes ao que se espera para a ordem, pois por meio da cromatografia gasosa acoplada á espectrometria de massas (GC-MS), os compostos encontrados de maior expressividade foram benzoquinonas e benzaldeídos, bem como os isômeros destes

compostos. Os efeitos que a secreção defensiva provoca no predador são decorrentes das propriedades que esses compostos apresentam, ou seja, forte repelência e odor desagradável, que causa incômodo e irritação na mucosa em casos de contato com humanos.

- A secreção defensiva dos milípedes compartilha de muitas semelhanças com as secreções defensivas de outros artrópodes, ou seja, este grupo utiliza praticamente as mesmas substâncias tóxicas e voláteis para repelir predadores e se proteger. Existe semelhança também quanto ao aparelho glandular, o qual na maioria das vezes é uma estrutura sacular provida de um ducto.

- Sugere-se que os compostos produzidos pelas células sejam armazenados na forma de cristais e disponibilizados somente no momento em que há a necessidade de produção da secreção, uma vez que os compostos da secreção defensiva são muito tóxicos e não é interessante que o organismo do animal armazene esses compostos em sua forma volátil.

## 7. REFERÊNCIAS

ANDERSON, J.M.; BIGNELL, D. E. Bacteria in the food, gut and feces of the litter feeding millipede *Glomeris marginata* (Villers). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 12, p. 251-254, 1980.

ANDERSON, J. M.; INESON, P.; HUIISH, S. A. Nitrogen and cation mobilization by soil fauna feeding on leaf litter and soil organic-matter from deciduous woodlands. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 15, p. 463–467, 1983.

ANDERSON, J.M.; LEONARD, M.A.; INESON, P.; HUIISH, S.A. Faunal biomass: A key component of a general model of nitrogen mineralization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 17, n. 5, p. 735-737, 1985.

ANDERSON, J. M.; LEONARD, M. A. Tree root and macrofauna effects on nitrification and nitrogen losses from deciduous leaf litter. **Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol, Paris**, v. 25, p. 373-384, 1988.

BAILEY, P. T.; MENDONCA, T. R. The distribution of the millipede *Ommatoiulus moreleti* (Diplopoda: Julida: Julidae) in relation to other *Ommatoiulus* species on the south- weterm Iberian Peninsula. **Journal of Zoology**, v.221, p.99-111, 1990.

BAKER, G.H., The distribution and abundance of the Portuguese millipede *Ommatoiulus moreleti* (Diplopoda: Julidae) in Australia. **Australian Journal of Ecology** v. 10, p. 249-59, 1985.

BIERNAUX, J. Incidence économique des Iules en culture betteravière. **Mededelingen van de Rijksfalculteit Landbouwwetenschappen te Gent**, n. 31, p. 717-729, 1966.

BLOWER, J.G. Millipedes: Keys and notes for the identification of the species. **Linnean Society of London/Estaurine and Brakisch-water Sciences association**, London, 1985, 242 p.

BOCCARDO, L; FERNANDES, M. N. Toxicidade do Carbamato Methiocarb para os

diplópodos *Gymnostreptus olivaceus* e *Plusioporus setiger*. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 13, n. 2, p. 29-33, 2000.

BOCCARDO, L.; PENTEADO, C.H.S.; JUCÁ-CHAGAS, R. Swarming of millipedes, a new case noticed in the district of Patrocínio – MG - Brazil. **Journal Advanced Zoology**, v.18, p.62-63, 1997.

BOCCARDO, L.; PENTEADO, C.H.S. JUCÁ-CHAGAS, R Migration and population outbreaks of millipedes in the coffee plantations, region of Alto Paranaíba, MG, Brazil. **Holos Environment**, v.2, p.220-223, 2002.

BOCCARDO, L. Surto de diplópodos em área urbana impactada localizada no município de Paulínia-SP. In: XXII Congresso Brasileiro de Zoologia, 1998, Recife, PE. **XXII Congresso Brasileiro de Zoologia**—Abstract 142 , 36, 1998 .

BOOCK, O. J.; LORDELLO, L. G. E. Diplopoda depredador de tubérculos de batatinha. **Bragantia**, São Paulo, v. 12, p. 343-347, 1952.

BRADE-BIRKS, S. G. Notes on Myriapoda XXXIII. The economic status of Diplopoda and Chilopoda and their allies. Part I. **Journal of the South-Eastern Agricultural College, Wye,Kent**, n. 26, p. 178-216, 1929.

BRADE-BIRKS, S. G. Notes on Myriapoda XXXIII. The economic status of Diplopoda and Chilopoda and their allies. Part II. **Journal of the South-Eastern Agricultural College, Wye,Kent**, n. 27, p. 103-146, 1930.

BUENO-VILLEGAS, J.; SIERWALD, P.; BOND, J. E. Diplopoda. IN: Bousquets, J. L., J. J. Morrone, O.Y. Ordóñez & I.V. Fernández (eds), **Biodiversidad, taxonomia y biogeografia de artrópodos de México**, IV, 569-599, 2004.

CORSEUIL, E.; CRUZ, F. Z.; SILVA, R. F. P. Ensaio laboratoriais visando o controle de *Armadillidium vulgare* (Latr. 1804) (Crustacea: Isopoda). **Public. Av. Mus. Nac.**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 7, p.12, 1986.

CORSEUIL, E.; CRUZ, F. Z. Experimento visando o controle de diplópodes. **Agron. sulriograndense**, Porto Alegre, v. 11, n. 1, p. 81-88, 1975.

CURRY, J. P. **Grassland Invertebrates: Ecology, influence on soil fertility and effects on plant growth**. Chapman and Hall, London, 1994, 437 p.

CLOUDSLEY-THOMPSON, J. L. Economics of the 'spotted snake millipede' *Blaniulus guttulatus* Bosc. **Annals and Magazine of Natural History**, Série. 12, n. 2, p. 947-962, 1950.

CRAWFORD, C. S.; BERCOVITZ, K.; WARBURG, M. R. Regional environments, life-history patterns and habitat use of Spirotreptid millipedes in arid regions. **Zoological Journal of the Linnean Society of London**, v.98, p.63-88, 1987.

DANGERFIELD, J.M. Abundance, biomass and diversity of soil macrofauna in savanna woodland and associated managed habitats. **Pedobiologia** v. 34, p.141-150, 1990.

EINSEBEIS, G.; WICHARD, W. Atlas on the biology of soil arthropods. **Springer-Verlag**, Berlin, 1987.

FARFAN, M. A. Some aspects of the ecology of millipedes (Diplopoda). Thesis, Graduate Program in Evolution, Ecology and Organismal Biology, The Ohio State University, 2010, 113p.

FONTANETTI, C. S.; CALLIGARIS, I. B.; SOUZA, T. S. Laudo sobre o surto de piolho-de-cobra no Parque das Universidades. Infestação de piolhos-de-cobra em Campinas. <http://www.barao/barao/pq-universidades/laudo.htm>. 2007.

FONTANETTI, C.S. ; CALLIGARIS, I. B. ; SOUZA, T. S. . A millipede infestation of an urban area of the city of Campinas, Brazil and preliminary toxicity studies of insecticide Bendiocarb® to the *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi & Fontanetti, 2006. **Arquivos do Instituto Biológico** (Online), v. 77, p. 165-166, 2010a.

FONTANETTI, C.S.; SOUZA, T. S.; CALLIGARIS, I. B.; BOZZATTO, V. Ovarian morphology and oogenesis dynamic of the diplopod *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi & Fontanetti, 2006 (Spirostreptidae), a potential plague in urban centers. **Animal Biology**, v. 60, p. 467-478, 2010b.

FONTANETTI, C. S.; CALLIGARIS, I. B.; SOUZA, T. S.; IAMONTE, M. Ultrastructure of Oocytes of the *Urostreptus atrobrunneus* (Diplopoda, Spirostreptida, Spirostreptidae): A potential urban centers plague. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, p. 1486-1491, 2012.

GASSEN, D. N. **Manejo de pragas associadas à cultura do milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 1996.

GUERRA, M.S. Receituário caseiro: alternativas para o controle de pragas e doenças de plantas cultivadas e de seus produtos. Brasília: **Embrater**, 1985.

HOFFMAN, R. L.; GOLOVATCH, S. I.; ADIS, J.; MORAIS, J. W. 5.2 Diplopoda, In: ADIS, J. (ed) **Amazonian Arachnida and Myriapoda**, Penssoft. Sofia-Moscow, p. 503-533, 2002.

HOFFMAN, R. L.; PAYNE, J. A. Diplopods as carnivores. **Ecology**, n. 50, p. 1096-1098, 1969.

HOPKIN, S.P.; READ, H.J. **The biology of millipedes**. New York: Oxford University Press, 2 ed., 233p, 1992.

Huge infestation of millipedes suspected of causing Australian train crash. <http://www.dailymail.co.uk/news/article-2412633/Huge-infestation-millipedes-suspected-causing-Australian-train-crash.html> 05/09/2013.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Livraria Editora Santos. 1983. 123p.

KANIA, G.; TRACZ, H. Mass occurrence and migration of *Ommatoiulus sabulosus*

(Linnaeus, 1758) (Diplopoda, Julida: Julidae) in Poland. **Peckiana**, v.4, p.57-66, 2005.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative at high osmolarity for use in electron microscopy. **The Journal of cell Biology**, v. 27, p. 137-138, 1965.

KIME, R. K.; GOLOVATCH, S. I. Trends in the ecological strategies and evolution of millipedes (Diplopoda). **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v.63, p.333-349, 2000.

LISON, L. Histochemie et cytochimie animales. Paris: Gauthier Villans, 1960. 842p.

LORDELLO, L. G. E. Observação sobre alguns diplópodos de interesse agrícola. **Anais da Escola Superior Luiz de Queiroz**, Piracicaba, v. 11, p. 69-76, 1954.

MAFF. **Millipedes and Centipedes**. Ministry of Agriculture Fisheries and Food, Advisory Leaflet. HMSO, London, 1984.

MARAUN, M.; SCHEU, S. Changes in microbial biomass, respiration and nutrient status of beech (*Fagus sylvatica*) leaf litter processed by millipedes (*Glomeris marginata*). **Oecologia** v. 107, p. 131–140, 1996.

McKILLUP, S. C.; BAILEY, P. T. Prospects for the biological control of the introduced milliped *Ommatoiulus moreletii* (Lucas) (Iulidae) in South Australia. **In: International Congress of Myriapod**, v. 7, p. 265-670, 1990.

MEINWALD, Y. C. MEINWALD, J.; EISNER, T.; 1,2 Dialkyl-4 (3H)-Quinoxalinones in the defensive secretion of a millipede (*Glomeris marginata*) . **Science**, v. 154, p. 390-391, 1966.

MOREIRA DE SOUSA, C.; FONTANETTI, C. S. Structure and function of the foregut and salivary glands of the synanthropic diplopod *Urostreptus atrobrunneus* (Spirostreptidae). **Animal Biology**, p. 1-12, 2012.

NIIJIMA, K.; SHINOHARA, K. Outbreaks of the *Parafontaria laminata* group (Diplopoda, Xystodesmidae). **Japan Journal Ecology**, v.38, p.257-268, 1988.

NIIJIMA, K. The outbreak of the train millipede. **Japanese Journal of Forest Environment**, v. 26, p. 25-32, 1984.

PEARSE, A. T. E. **Histochemistry: theoretical and applied**. London: J&A. Churchill, 1960, 998p.

PERACCHI, A. L.; NUNES, W. O. Sobre um diplópodo prejudicial à cultura da mandioca (*Manihot esculenta*). **Pesq. Agrop. Bras., Série Agronomia**, Brasília, v. 7, p. 181-183, 1972.

RAWLINS, A. J. BULL, I. D.; POIRIER, N.; INESON, P.; EVERSLED, R.P. The biochemical transformation of oak (*Quercus robur*) leaf litter consumed by the pill millipede (*Glomeris marginata*). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 1063-1076, 2006.

ROMÃO, J. A.; BOCCARDO, L.; DE PAULA, U. F.; CHAGAS, R. J.; MOREIRA, B. O. Toxicidade de extratos de *Pipernigrum*, piperina e piperamidas para o diplópodo *Orthoporus fuscipes* em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 21, n. 1, p. 33-38, 2008.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados: Uma Abordagem Funcional-evolutiva**. 7 ed. São Paulo. Roca, 2005. 1145p.

SCHEU, S., WOLTERS, V. Influence of fragmentation and bioturbation on the decomposition of <sup>14</sup>C-labelled beech leaf litter. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 23, p. 1029-1034, 1991.

SCHUBART, O. Os myriapodes e suas relações com a agricultura. **Papéis avulsos Lool**, São Paulo, v. 2, p. 205-234, 1942.

SCHUBART, O. Os Proterospermophora do Distrito Federal (Myriapoda, Diplopoda). **Arquiv. Mus. Nac.**, Rio de Janeiro, v. 38, p.1-156, 1945.

STRIGANOVA, B. R. A comparative account of the activity of different groups of soil invertebrates in the decomposition of forest litter. **Soviet Journal of Ecology**, v. 2, p. 316-321, 1971.

SRIVASTAVA, P.D.; SRIVASTAVA, Y. N. *Orthomorpha* sp., a new predatory millipede on *Achatenia fulica* in Andamans. **Experientia**, v.23, p.776, 1967.

SWIFT, M. J., HEAL, O. W.; ANDERSON, J. M. Decomposition in Terrestrial Ecosystems. Studies in Ecology, University of California Press, Berkeley, California, v. 5, 1979.

VALDERRAMA, X.; ROBISON, J. G.; ATTYGALLE, A. B.; EISNER, T. Seasonal anointment with millipedes in a wild primate: a chemical defense against insects? **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 12, p, 2781-2790, 2000.

VISSER, S. Role of the soil invertebrates in determining the composition of soil microbial communities. In: Fitter, A.H., Atkinson, D., Read, D.J., Usher, M.B. (Eds.), **Ecological Interactions in Soil**. Blackwell, Oxford, p. 297–317, 1985.